

日本国特許庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日 2003年 3月12日
Date of Application:

出願番号 特願2003-066310
Application Number:
[ST. 10/C]: [JP 2003-066310]

出願人 日本原子力研究所
Applicant(s):

2004年 1月23日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今井 康



出証番号 出証特2004-3002438

【書類名】 特許願

【整理番号】 030385

【提出日】 平成15年 3月12日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 C12N

【発明者】

【住所又は居所】 群馬県高崎市綿貫町 1 2 3 3 番地 日本原子力研究所
高崎研究所内

【氏名】 北村 智

【発明者】

【住所又は居所】 群馬県高崎市綿貫町 1 2 3 3 番地 日本原子力研究所
高崎研究所内

【氏名】 鹿園 直哉

【発明者】

【住所又は居所】 群馬県高崎市綿貫町 1 2 3 3 番地 日本原子力研究所
高崎研究所内

【氏名】 田中 淳

【特許出願人】

【識別番号】 000004097

【氏名又は名称】 日本原子力研究所

【代理人】

【識別番号】 100089705

【住所又は居所】 東京都千代田区大手町二丁目 2 番 1 号 新大手町ビル 2
0 6 区 ユアサハラ法律特許事務所

【弁理士】

【氏名又は名称】 社本 一夫

【電話番号】 03-3270-6641

【選任した代理人】

【識別番号】 100076691

【弁理士】

【氏名又は名称】 増井 忠武

【選任した代理人】

【識別番号】 100075270

【弁理士】

【氏名又は名称】 小林 泰

【選任した代理人】

【識別番号】 100080137

【弁理士】

【氏名又は名称】 千葉 昭男

【選任した代理人】

【識別番号】 100096013

【弁理士】

【氏名又は名称】 富田 博行

【選任した代理人】

【識別番号】 100117813

【弁理士】

【氏名又は名称】 深澤 憲広

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 051806

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 植物色素蓄積遺伝子

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 (i) SEQ ID NO: 1で示される塩基配列またはこれと縮重の関係にある塩基配列；

(ii) SEQ ID NO: 1で示される塩基配列において1もしくは複数個の塩基が欠失、置換もしくは付加された塩基配列；

(iii) SEQ ID NO: 1で示される塩基配列と相補的な塩基配列との間で、ストリンジェントな条件下においてハイブリダイズ可能な塩基配列；もしくは

(iv) SEQ ID NO: 1で示される塩基配列との間で少なくとも60%の塩基配列相同性を有する塩基配列；

からなる群から選択される塩基配列であって、植物細胞中においてフラボノイドを液胞中に区画化させる活性を有するタンパク質をコードする塩基配列を有する核酸。

【請求項 2】 (a) SEQ ID NO: 2で示されるアミノ酸配列；

(b) SEQ ID NO: 2で示されるアミノ酸配列において1もしくは複数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列；もしくは

(c) SEQ ID NO: 2で示されるアミノ酸配列との間で少なくとも60%のアミノ酸配列相同性を有するアミノ酸配列；

からなる群から選択されるアミノ酸配列からなる、植物細胞中においてフラボノイドを液胞中に区画化させる活性を有するタンパク質をコードする核酸。

【請求項 3】 請求項1または2に記載の核酸によりコードされ、植物細胞中においてフラボノイドを液胞中に区画化させる活性を有するタンパク質。

【請求項 4】 請求項1または2に記載の核酸を含有する組換えベクター。

【請求項 5】 請求項4に記載の組換えベクターを含む、形質転換体植物細胞。

【請求項 6】 請求項1または2に記載の核酸を含むトランスジェニック植物。

【請求項 7】 請求項5に記載の形質転換体植物細胞を培地中で培養し、もしくは請求項6に記載のトランスジェニック植物を生長させ、培養された形質転換

植物細胞もしくはトランスジェニック植物から、液胞中に蓄積されたフラボノイドを採取することからなる、フラボノイドの製造方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、植物細胞中においてフラボノイドを液胞中に区画化させる活性を有するタンパク質、およびそれをコードする遺伝子に関する。本発明はまた、この遺伝子を含有する形質転換体植物に関する。

【0002】

【従来の技術】

フラボノイドは、植物界において特有の二次代謝代謝産物である。それらには、3種類の主要なサブクラス：すなわち、フラボノール類、アントシアニン類、およびプロアントシアニジン類（PA；いわゆる縮合型タンニン）が含まれる。UV-B保護剤、植物と微生物とのあいだのシグナル伝達分子、およびオーキシン輸送の調節物質といった、植物におけるフラボノイドの多数の機能（Winkel-Shirley, B. (2001). *Plant Physiol.* 126, 485-493中にレビューされる）に関わらず、フラボノイド類の損失または欠失は一般的に、植物の生長および発育において何ら有害性の作用を及ぼすことがなく、そしていくつかの特定の器官における色の变化として容易に検出される。これらの事実が、植物におけるフラボノイド生合成経路を明らかにするために、彩色の減少または変化を伴う変異株を単離するきっかけとなった。

【0003】

トウモロコシ穀粒におけるフラボノイド色素の変化は、これまでのところ最も徹底的に研究されたものの一つであり、それはアントシアニン経路の立証に寄与した。観葉植物種での分子育種を目的として、ペチュニアおよびキンギョソウにおいて多数の変異株が単離された（Mol, J., Grotewold, E., and Koes, R. (1998). *Trends Plant Sci.* 3, 212-217）。最近10年間にわたって、シロイヌナズナ（*Arabidopsis*）における分子遺伝学が発展してきた。フラボノイド色素を欠失したシロイヌナズナ変異株のほとんどは、トランスパレントテスト（透明な種

皮、transparent testa; tt) として記載された (Koornneef, M. (1990). Arabidopsis Inf. Serv. 27, 1-4)。

【0004】

現在までのところ、21種のtt遺伝子座が同定され、そしてそのうちのほぼ半分について詳細に解析が行われた。tt変異株についての解析により、シロイヌナズナフラボノイド経路(図1)における多数の構造遺伝子および調節遺伝子がクローニングされ、そして特性決定された。構造遺伝子は、フラボノール合成酵素遺伝子 (FLS) 以外は1-コピーであるため、シロイヌナズナフラボノイド生合成経路は、植物の代謝についての調節および細胞レベル下の構成を解析するためのモデルとして貴重なものである (Winkel-Shirley, B. (1999). Physiol. Plant. 107, 142-149中でレビューされる)。

【0005】

フラボノイド合成はサイトゾル中で進行するが、それらの最終生成物のほとんどは、最終的には液胞中に蓄積される。フラボノイド類を含む多くの二次代謝物は、それらを生成する細胞中でさえ細胞傷害性でありそして遺伝毒性を有するものであるため、植物における外来性の毒性化合物に対する隔離システムと同様のまたはそれと関連する隔離システムが存在すると考えられている。植物における外来物質の解毒は、3つの段階: すなわち、(I) 通常は加水分解または酸化により反応性を高くする活性化段階、(II) 第(I)段階で代謝された化合物とグルコース、マロン酸またはグルタチオンなどの親水性分子との抱合段階、そして(III) 膜-結合型輸送タンパク質によるサイトゾルからの放出段階、から構成される (Coleman, J.O.D., et al., (1997). Trends Plant Sci. 2, 144-151)。

【0006】

第(I)段階での主要な反応は、チトクロームP-450により触媒され、そしてP-450酵素の中には、シンナメート4-ヒドロキシラーゼ、F3'H、F3'5'Hなどのフラボノイド生合成経路に関与するものもある (Winkel-Shirley, 2001、上述)。アントシアニンの解毒に関して、グルコシル基が3位に結合することが、前駆体 (アントシアニンジゲン類) を可溶化するために必要であり、そして対応するトランスフェラーゼ、UDP-グルコース: フラボノイドグルコシルトランスフェラーゼ (UF

GT) が、アントシアニン経路における構造的酵素の一つであるといわれる。これまでに同定されたアントシアニン類の構造に基づいて、それらはメチル化、アシル化、そしてグリコシル化などの様々な修飾を受けなければならない、そして対応する遺伝子の中には、ペチュニアで同定されたものもあった (例えば、Bruglieri, F., et al., (1994). *Plant J.* 5, 81-92)。

【0007】

さらに、グルタチオンS-トランスフェラーゼ (GST) がアントシアニン色素沈着のために必須であると報告された。トウモロコシのBZ2およびペチュニアのAN9は、GSTタンパク質をコードしており、そしてそれらは、機能的に互いに補い合うことができる (Alfenito, M.R., et al., (1998). *Plant Cell* 10, 1135-1149)。これらのGSTの機能は、最初は、アントシアニジン-3-グルコシド類のグルタチオン-抱合体を形成することであると考えられた (Marrs, K.A., et al., (1995). *Nature* 375, 397-400)。

【0008】

アントシアニン類と比較すれば、PA類またはそれらの前駆体の修飾および区画化のメカニズムは、あまりよくわかっていない。PA蓄積メカニズムに関する現在の仮説モデルは、ダグラスファー (ベイマツ、Douglas-fir) から得られたデータに大きく依存している (Stafford, H.A. (1989). *The enzymology of proanthocyanidin biosynthesis*. In *Chemistry and significance of condensed tannins* (Hemingway, R.W. and Karchesy J.J. eds). New York: Plenum Press, pp. 47-70中にレビューされる)。

【0009】

PA類は、開始体としてのフラバン3-オール類および伸長体としてのフラバン3, 4-ジオール類 (ロイコアントシアニジン類) からなると考えられてきたが、しかし2,3-cis-フラバン3-オール類が伸長体として関与する別の経路が最近示唆された (Xie, D.-Y., et al., (2003). *Science* 299, 396-399; 図1)。

【0010】

液胞 (または小胞体の内腔; Stafford, 1989、上述) 中へのそれらの取り込みは、ポリマー型ではなく、モノマー型として行われる様である (Debeaujon, I.,

et al., (2001). Plant Cell 13, 853-871)。前駆体は、徐々に縮合され、そして形成されたポリマーが酸化され、その結果褐色となる（図1）。

【0011】

縮合工程および酸化工程は、おそらくは酵素的に行われるが、その一方で非酵素的反応を容易に行うことができる（Stafford, 1989、上述）。おそらくは縮合および／または蓄積工程に関与しているいくつかのオオムギの変異体が、タンニン（プロアントシアニジン）-欠損（ant）変異体として報告されたが（Gruber, M.Y., et al., (1999). Genetic systems for condensed tannin biotechnology . In Plant Polyphenols 2: Chemistry and Biology. (Gross, G.G., Hemingway, R.W., and Yoshida, T. eds). New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers, pp. 315-341)、しかしPA前駆体合成後のそれらの区画化、ポリマー化、および酸化についての分子的証拠および生化学的証拠は、未だ明らかになっていない。

【0012】

シロイヌナズナにおいて、フラボノイド類についての区画化メカニズムは、アントシアニン類についてさえ、それらの生合成経路と比較して、未だ明らかになっていない（図1）。このシチュエーションは、主としてtt変異株のほとんどが、フラボノイドの“輸送”工程ではなく、“合成”工程を欠損していることに限定されているという事実により、説明される。例外は、tt12変異株の場合である。Debeaujonら（2001、上述）は、TT12遺伝子を単離し、そしてTT12が、シロイヌナズナ種子外被におけるPA前駆体の液胞への隔離の、少なくとも一部を担う推定トランスポーターであることを示唆した。

【0013】

本発明者らは以前に、イオンビーム照射の変異率をシロイヌナズナにおいて研究している際に、2種の新規なtt変異株を得た（Shikazono, N., et al., (2003). Genetics, in press)。そのうちの一つは、tt18変異株（Winkel-Shirley, 2001（上述）においてかつてtt19として命名された）であり、その中ではロイコアントシアニジンジオキシゲナーゼ（LDOX）と推定されるタンパク質をコードする遺伝子が欠陥を起こしていた。もう一方は、tt19変異株として定義されるが、現

在までのところ、tt19変異株の原因遺伝子、およびtt19変異株の性質は解明されていない。

【0014】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、以上のとおりの事情を鑑みてなされたものであり、tt19変異株の特徴を解析することを課題とするとともに、tt19変異株を引き起こす原因遺伝子を同定し、その性質を解析することを課題とする。さらに、同定された原因遺伝子の性質を利用して、形質転換植物体を提供することもまた課題とする。

【0015】

【課題を解決するための手段】

本発明の発明者らは、tt19変異株の原因遺伝子を解析し、そしてtt19変異株の性質を解明することにより、上記課題について種々検討した結果、トランスパレント・テスト19 (TT19) 遺伝子と命名した新規の遺伝子をクローニングし、その遺伝子のDNA塩基配列の解析およびそのTT19遺伝子のDNAによりコードされるタンパク質の解析を行うことにより、本発明を完成するに至った。

【0016】

すなわち、本発明の一態様において、植物細胞中においてフラボノイドを液胞中に区画化させる活性を有するタンパク質をコードする核酸を提供する。上述する本発明の核酸には、(i) SEQ ID NO: 1で示される塩基配列またはこれと縮重の関係にある塩基配列を含む核酸；(ii) SEQ ID NO: 1で示される塩基配列において1もしくは複数個の塩基が欠失、置換もしくは付加された塩基配列を含む核酸；(iii) SEQ ID NO: 1で示される塩基配列と相補的な塩基配列との間で、ストリンジェントな条件下においてハイブリダイズ可能な塩基配列を含む核酸；もしくは(iv) SEQ ID NO: 1で示される塩基配列との間で少なくとも60%、より好ましくは少なくとも70%、より好ましくは少なくとも80%、最も好ましくは少なくとも90%の塩基配列相同性を有する塩基配列を含む核酸；が含まれる。

【0017】

また、本発明の別の態様において、植物細胞中においてフラボノイドを液胞中に区画化させる活性を有するタンパク質をコードする塩基配列を有する核酸もま

た提供する。上述する本発明の核酸は、(a) SEQ ID NO: 2で示されるアミノ酸配列を有するタンパク質をコードする核酸；(b) SEQ ID NO: 2で示されるアミノ酸配列において1もしくは複数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列を有するタンパク質をコードする核酸；もしくは(c) SEQ ID NO: 2で示されるアミノ酸配列との間で少なくとも60%、より好ましくは少なくとも70%、より好ましくは少なくとも80%、最も好ましくは少なくとも90%のアミノ酸配列相同性を有するアミノ酸配列を有するタンパク質をコードする核酸；からなる群から選択される核酸が含まれる。

【0018】

本発明はまた、上述したような(i)～(iv)に記載する核酸または(a)～(c)に記載する核酸によりコードされ、植物細胞中においてフラボノイドを液胞中に区画化させる活性を有するタンパク質もまた、提供する。

【0019】

本発明は別の態様において、(i)～(iv)に記載する核酸、あるいは(a)～(c)に記載する核酸のいずれかを含有する組換えベクター；上述した組換えベクターのいずれかを含み形質転換体植物細胞；もまた提供する。

【0020】

本発明はさらに別の態様において、前述した形質転換体植物細胞を培地中で培養し、もしくは前述したトランスジェニック植物を生長させ、培養された形質転換植物細胞もしくはトランスジェニック植物から、液胞中に蓄積されたフラボノイドを採取することからなる、フラボノイドの製造方法；を提供する。

【0021】

【発明の実施の形態】

本発明の発明者らは、シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) の乾燥種子に対してイオンビームを照射することにより得られた、tt19変異株として定義されるシロイヌナズナの変異株の原因遺伝子を同定し、そしてtt19変異株の性質を解明した。本発明において解析の対象としたtt19変異株は、茎の基部領域やロゼット葉の色素沈着を持たず、種子外被に褐色色素を持たないことを特徴としている。これは、フラボノイド色素が茎や葉、種子外被に蓄積しないために生じたと考

えられる。しかしながら、フラボノイドの合成に関連する遺伝子に変異を生じているためにフラボノイドが蓄積しないのか、それともフラボノイドの輸送や蓄積に関連する遺伝子に変異を生じているからフラボノイドが蓄積しないのかは、視覚的な解析のみでは判断できない。

【0022】

そのため、本発明の発明者らはまず、原因遺伝子を同定するための研究を行った。その結果、tt19変異株においては、転座変異が生じていることがわかった。tt19変異株において転座変異を生じた遺伝子座領域をシロイヌナズナ野生型コロンビア (Col) 株において解析し、tt19変異株において変異した遺伝子を解析したところ、tt19変異株においては、SEQ ID NO: 1に示される645 bpのオープンリーディングフレームからなる塩基配列を有し、SEQ ID NO: 2に示されるアミノ酸配列を有する214アミノ酸からなるタンパク質をコードする、TT19遺伝子と命名した遺伝子に変異を起こしていることがわかった。

【0023】

上述したTT19遺伝子のヌクレオチド配列およびTT19タンパク質のアミノ酸配列をClustalW ver. 1.7 (Thompson, J.D., et al., (1994). Nucleic Acids Res. 22, 4673-4680) により解析したところ、mRNAレベルで、ペチュニアのAN9遺伝子の核酸配列と約55%、トウモロコシのBZ2遺伝子の核酸配列と約40%、シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) のESTクローンH36860の核酸配列と約75%、の塩基配列相同性を有し、タンパク質レベルでは、H36860のアミノ酸配列と約70%、ペチュニアのAN9のアミノ酸配列と約50%、トウモロコシのBZ2のアミノ酸配列と約15%、のアミノ酸配列相同性を有する。ペチュニアのAN9遺伝子およびトウモロコシのBZ2遺伝子は、それぞれペチュニアおよびトウモロコシにおいてアントシアニン色素沈着のために必要であることが知られているグルタチオンS-トランスフェラーゼ (GST) 遺伝子である。このことから、上述したTT19遺伝子は、アントシアニン色素沈着のために必要なGST様遺伝子であることが推定された。

【0024】

ついで、同定されたTT19遺伝子の機能を解析するために、この遺伝子およびこの遺伝子の真性プロモーターを含む発現ベクターにより、tt19変異株を形質転換

したところ、シロイヌナズナ野生型Col株において見られた茎の基部領域やロゼット葉の色素沈着、さらには種子外被に褐色色素の沈着が回復されることが見いだされた。TT19の機能をさらに詳細に検討したところ、TT19遺伝子に変異していた場合には、フラボノイドは正常に合成されていたものの、合成されたフラボノイドが細胞内の液胞に正常に蓄積されなかったことから、TT19タンパク質はフラボノイド色素が液胞に区画化される際に必要とされていることが明らかになった。

【0025】

一方、本発明のTT19と核酸レベルおよびアミノ酸レベルで相同性を有するペチュニアのAN9は、ペチュニアにおいてアントシアニン類を液胞に区画化する際に必要とされる分子であることが知られていたことから、この遺伝子を強力なプロモーターであるカリフラワーモザイクウイルス (CaMV) 35Sプロモーターで制御したAN9遺伝子を用いてシロイヌナズナのtt19変異株を形質転換し、TT19の機能が相補されるかどうかを確認した。その結果、AN9遺伝子により形質転換しても、アントシアニン類の液胞への区画化は回復するものの、アントシアニン類などのその他のフラボノイドの液胞への区画化は回復しない、すなわちTT19遺伝子の機能はAN9遺伝子によっては完全には相補されないことが明らかになった。

【0026】

以上の結果から、本発明は、植物細胞中においてフラボノイドを液胞中に区画化させる活性を有するタンパク質をコードする塩基配列を有する核酸を提供することができ、ここで本発明の核酸には、

(i) SEQ ID NO: 1で示される塩基配列またはこれと縮重の関係にある塩基配列を含む核酸；

(ii) SEQ ID NO: 1で示される塩基配列において1もしくは複数個の塩基が欠失、置換もしくは付加された塩基配列を含む核酸；

(iii) SEQ ID NO: 1で示される塩基配列と相補的な塩基配列との間で、ストリンジェントな条件下においてハイブリダイズ可能な塩基配列を含む核酸；もしくは

(iv) SEQ ID NO: 1で示される塩基配列との間で少なくとも60%、より好まし

くは少なくとも70%、より好ましくは少なくとも80%、最も好ましくは少なくとも90%の塩基配列相同性を有する塩基配列を含む核酸；

(a) SEQ ID NO: 2で示されるアミノ酸配列を有するタンパク質をコードする核酸；

(b) SEQ ID NO: 2で示されるアミノ酸配列において1もしくは複数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列を有するタンパク質をコードする核酸；もしくは

(c) SEQ ID NO: 2で示されるアミノ酸配列との間で少なくとも60%、より好ましくは少なくとも70%、より好ましくは少なくとも80%、最も好ましくは少なくとも90%のアミノ酸配列相同性を有するアミノ酸配列を有するタンパク質をコードする核酸；

が含まれる。

【0027】

本明細書中で「フラボノイド」という場合、アントシアニン類、アントシアニン類、タンニン類などが含まれ、そのフラボノイドを液胞中に区画化させる活性という場合、例えば花卉、葉、茎、根、種子などの植物細胞中で合成されたフラボノイドを植物細胞の液胞中に蓄積させ、細胞質中のみならず細胞外へも流出しないようにする活性のことをいう。

【0028】

本発明において「1もしくは複数個」という場合、「1もしくは複数個」とは、好ましくは1~20個、より好ましくは1~10個、最も好ましくは1~5個のことをいう。また、本発明において塩基の「欠失」、「置換」、「付加」を有する核酸は、TT19遺伝子の塩基配列 (SEQ ID NO: 1) において生じ、かつTT19タンパク質と同様の性質を有するようなタンパク質をコードする核酸をいい、アミノ酸の「欠失」、「置換」、「付加」を有するタンパク質は、TT19タンパク質 (SEQ ID NO: 2) と同様の性質を有するタンパク質をいう。例えば、アミノ酸の「置換」の場合には、同様の性質を有するアミノ酸同士の置換、例えばある疎水性アミノ酸から別の疎水性アミノ酸への置換、ある親水性アミノ酸から別の親水性アミノ酸への置換、ある酸性アミノ酸から別の酸性アミノ酸への置換、あるいはある塩基性ア

ミノ酸から別の塩基性アミノ酸への置換、などの置換が含まれる。

【0029】

上述のような「欠失」、「置換」、「付加」を有する塩基配列、または上述のような「欠失」、「置換」、「付加」を有するタンパク質を作成するためには、イオンビーム照射や変異原処理などの細胞レベルでの変異生成処理の他、部位特異的変異生成 (Site Directed Mutagenesis) やPCR増幅ミスを用いたランダム変異生成 (Random Mutagenesis)、カセット導入変異生成 (Cassette Mutagenesis) などの遺伝子工学的変異生成処理などの、本発明の技術分野において既知の様々な方法を用いることができる。

【0030】

本発明の植物細胞中においてフラボノイドを液胞中に区画化させる活性を有するタンパク質をコードする塩基配列には、TT19遺伝子の塩基配列 (SEQ ID NO: 1) と相補的な塩基配列との間で、ストリンジェントな条件下においてハイブリダイズ可能な塩基配列を含むDNAを有し、かつDNA修復促進活性を有するタンパク質をコードする塩基配列も含まれる。

【0031】

本発明において、ストリンジェントな条件とは、目的の塩基配列が、TT19遺伝子をコードする塩基配列 (例えば、SEQ ID NO: 1) もしくはこれと縮重の関係にある塩基配列との間で、特異的にハイブリダイズ可能である条件をいう。ハイブリダイズ条件は、温度、イオン濃度などの条件を考慮して決定されるが、一般的には温度が高いほど、またイオン濃度が低いほどストリンジェントな程度が高くなることが知られている。このようなストリンジェントな条件の設定は、当業者であれば、例えば、SambrookおよびRussel (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd edition (2001)) の記載に基づいて行うことができる。これらのストリンジェントな条件の具体的な例としては、例えば、6×SSC、5×Denhardt's、0.1% SDS、25℃ないし68℃などのハイブリダイゼーション条件を使用することが考えられる。この場合、ハイブリダイゼーションの温度としては、より好ましくは45℃ないし68℃ (ホルムアミド無し) または25℃ないし50℃ (50%ホルムアミド) を挙げることができる。

【 0 0 3 2 】

本発明においてアミノ酸あるいは塩基配列の配列相同性は、視覚的検査および数学的計算により決定してもよい。あるいは、2つのタンパク質配列の配列相同性は、NeedlemanおよびWunsch (J. Mol Biol., 48: 443-453, 1970) のアルゴリズムに基づき、そしてウイスコンシン大学遺伝学コンピューターグループ (UW GCG) より入手可能なGAPコンピュータープログラムを用い配列情報を比較することにより、決定してもよい。GAPプログラムの好ましいデフォルトパラメーターには： (1) HenikoffおよびHenikoff (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89: 10915-10919, 1992) に記載されるような、スコアリング・マトリックス、blosum62； (2) 12のギャップ加重； (3) 4のギャップ長加重；および (4) 末端ギャップに対するペナルティなし、が含まれる。

【 0 0 3 3 】

本発明においてアミノ酸あるいは塩基配列の配列相同性解析には、当業者に用いられる、配列比較の他のプログラムもまた、用いてもよい。例えばAltschulら (Nucl. Acids. Res. 25., p. 3389-3402, 1997) に記載されているBLASTプログラムを用いて配列情報と比較し決定することが可能である。具体的には、塩基配列解析の場合、Nucleotide BLAST (BLASTN) プログラムで、Query塩基配列を入力して、GenBank、EMBL、DDBJなどの塩基配列データベースと照合することができる。また、アミノ酸配列解析の場合、Protein BLAST (BLASTP) プログラムで、Queryアミノ酸配列を入力して、GenBank CDS、PDB、SwissProt、PIRなどのアミノ酸配列データベースと照合することができる。当該プログラムは、インターネット上でNational Center for Biotechnology Information (NCBI)、あるいはDNA Data Bank of Japan (DDBJ) のウェブサイトから利用することが可能である。BLASTプログラムによる相同性検索の各種条件（パラメーター）は同サイトに詳しく記載されており、一部の設定を適宜変更することが可能であるが、検索は通常デフォルト値を用いて行う。当業者に用いられる、配列比較の他のプログラム、例えばClustalW ver. 1.7 (Thompson, J.D., et al., (1994)、上述) もまた、用いてもよい。

【 0 0 3 4 】

本発明はまた、植物細胞中においてフラボノイドを液胞中に区画化させる活性を有するタンパク質を提供することができ、ここで本発明のタンパク質には、上述したような (i) ~ (iv) に記載する核酸または (a) ~ (c) に記載する核酸によりコードされるタンパク質、例えば SEQ ID NO: 2 に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質が含まれる。

【0035】

本発明はまた、前述した (i) ~ (iv) に記載する核酸または (a) ~ (c) に記載する核酸を含有する組換えベクターもまた提供することができる。このような組換えベクターは、適切なベクター中に本発明の前述した (i) ~ (iv) に記載する核酸または (a) ~ (c) に記載する核酸を連結することにより得ることができる。本発明において使用することができるベクターとしては、宿主細胞中で複製可能なものであればどのようなものを使用してもよく、例えば、プラスミド DNA、ファージ DNA などを使用することができる。プラスミド DNA としては、大腸菌由来のプラスミド（例えば pUC19、pBR322 など）、枯草菌由来のプラスミド（例えば pAM α 1 など）、酵母由来のプラスミド（例えば pGILDA、YAC など）などを使用することができ、ファージ DNA としては、 λ ファージ（ λ EMBL、 λ ZAP、 λ gt 10 など）などを使用することができる。このようなベクターに前述した (i) ~ (iv) に記載する核酸または (a) ~ (c) に記載する核酸を挿入するためには、ベクターを適当な制限酵素で切断し、その制限酵素と同じ切断末端を生じる制限酵素により処理した前述した (i) ~ (iv) に記載する核酸または (a) ~ (c) に記載する核酸を、ベクターの切断部分に挿入する。

【0036】

このベクター中には、(i) ~ (iv) に記載する核酸または (a) ~ (c) に記載する核酸に加えて、この核酸の発現を制御するための配列、ベクターのゲノム中への取り込みを促進するための配列（例えば T-DNA 配列など）、および／または選択マーカー（例えば、ジヒドロ葉酸レダクターゼ遺伝子、カナマイシン耐性遺伝子、ハイグロマイシン耐性遺伝子など）の配列を含んでもよい。上述の核酸の発現を制御するための配列としては、例えばプロモーター、エンハンサー、スプライシングシグナル、ポリ (A) 付加シグナルなどを使用することができ

る。ここでプロモーターは、植物で一般に多用されるカリフラワーモザイクウイルス由来の35Sプロモーター以外に、当業者であれば、ベクターを形質転換する植物での目的に応じて適宜選択することができ、例えば植物がシロイヌナズナの花の場合にはシロイヌナズナの花で高発現する内在性の遺伝子のプロモーターを使用することができる。

【0037】

本発明においては、前述の組換えベクターを含む形質転換体植物細胞もまた、提供することができる。本発明の形質転換体植物細胞は、本発明の組換えベクターを宿主となる植物細胞中に導入することにより得ることができる。本発明において形質転換させる植物細胞は、植物体のうちいずれの部分に由来する細胞であってもよく、例えば、葉、花卉、茎、根、種子などの他、培養植物細胞であってもよい。植物細胞の由来となる植物には特に限定はないが、例えばアブラナ科、イネ科、マメ科などの植物が含まれる。

【0038】

植物細胞に対する前述の組換えベクターの形質転換は、当該技術分野において既知の形質転換法、例えばアグロバクテリウム法、エレクトロポレーション法、パーティクルガン法、ポリエチレングリコール法（PEG法）などを使用することにより行う。

【0039】

アグロバクテリウム法を用いる場合は、構築した植物用発現ベクターを適当なアグロバクテリウム、例えば *Agrobacterium tumefaciens* に導入し、この株をバキュームインフィルトレーション法（Bechtold et al. (1993) C. R. Acad. Sci. Ser. III Sci. Vie, 316, 1194-1199）、フローラル・ディップ法（Clough, S. J., and Bent, A.F. (1998). Plant J. 16, 735-743）などに従って宿主の無菌培養葉片に感染させ、形質転換植物を得ることができる。

【0040】

エレクトロポレーション法を用いる場合は、パルスコントローラーを備えたエレクトロポレーション装置により、電圧500~600 V、1000 μ F、20 msecの条件で処理し、遺伝子を宿主に導入する。

【0041】

また、パーティクルガン法を用いる場合は、植物体、植物器官、植物組織自体をそのまま使用してもよく、切片を調製した後に使用してもよく、プロトプラストを調製して使用してもよい。このように調製した試料を遺伝子導入装置（例えばBIOLISTIC POS 1000/He; BioRadなど）を用いて処理することができる。処理条件は植物または試料により異なるが、通常は1000～1100 psi程度の圧力、5～10 cm程度の距離で行う。

【0042】

ポリエチレングリコール法（PEG法）を用いる場合は、主に、培養細胞からプロトプラストを調整し、カルシウム、リン酸の存在下のもとPEGを加えてDNA細胞に取り込ませる。

【0043】

植物細胞中に目的とする（i）～（iv）に記載する核酸または（a）～（c）に記載する核酸が形質転換されたかどうかについては、PCR法、サザンハイブリダイゼーション法、ノザンハイブリダイゼーション法、などにより確認することができる。例えばPCR法により確認する場合、形質転換体植物細胞からDNAを調製し、もしくはmRNAを採取した後cDNAを調製し、当該DNAもしくはcDNAを鋳型として用いて、所望の核酸を特異的に増幅させることができる様に設計されたプライマーを使用して、PCR法を行うことにより確認する。

【0044】

本発明においてはさらに、このようにして得られた植物細胞を培養し、再分化・育成することにより、（i）～（iv）に記載する核酸または（a）～（c）に記載する核酸を含むトランスジェニック植物を作出することができる。植物細胞を植物体に再分化させる際には、培地から植物ホルモンを取り除くか、または適当な濃度の植物ホルモン、例えばオーキシン、サイトカイニン、ジベレリン、アブシジン酸などを単独でもしくは組み合わせて投与する。

【0045】

本発明においては、前述した形質転換体植物細胞を培地中で培養し、もしくは前述したトランスジェニック植物を生長させ、培養された形質転換植物細胞もし

くはトランスジェニック植物から、液胞中に蓄積されたフラボノイドを採取することからなる、フラボノイドの製造方法；を提供することもできる。植物細胞を培養するための培地としては、当該技術分野において既知の植物培養用培地、例えばMS基本培地、LS基本培地、プロトプラスト培養培地（LS培地を改変したもの）などを使用することができ、これらの培地に対してショ糖、各種ビタミン、アミノ酸などの添加物を添加してもよい。

【0046】

培養する際には、固体培地を用いた固体培養法、液体培地を用いた液体培養法のいずれを使用してもよい。培養を行う場合には、培地のpHを5.0～7.0に調節し、20～30℃、好ましくは23～28℃前後で、5日～2ヶ月間、培養する。トランスジェニック植物を生長させる際には、圃場および温室内での土壌栽培、温室内での水耕栽培、人工培養器などを使用することができる。

【0047】

培養植物細胞またはトランスジェニック植物の液胞中に蓄積されたフラボノイドは、植物細胞もしくはトランスジェニック植物から液胞を採取するか、さらに得られた液胞からフラボノイドを精製することによって採取することができる。本発明においては、セルラーゼ、ペクチナーゼなどの酵素を用いて細胞壁を溶解し、可溶化溶液中での超音波破碎処理や磨砕処理などにより細胞を破壊し、さらにろ過または遠心分離などにより不溶物を除去した後、メタノール、ヘキサンあるいはアセトンなどの有機溶媒画分を採取することにより、植物細胞もしくはトランスジェニック植物からフラボノイドを含む液胞を含有する溶液を得る。このようにして調製された液胞からフラボノイドを精製するためには、さらに、各種クロマトグラフィー（例えば高速液体クロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー、ガスクロマトグラフィーなど）、などを、単独または組み合わせて行う。

【0048】

本発明をさらに具体的に説明するため、以下に実施例を記載する。本発明の範囲がこれらに限定されるものではない。

【0049】

【実施例】

実施例1: 植物材料の作出

tt19変異株の変異生成および単離は、以前に記載されている (Shikazono et al., 2003、上述)。簡単に説明すると、シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) エコタイプコロンビア (Col) 株の乾燥種子 (26,000粒) に、150 Gyの加速炭素イオン粒子を照射することにより、変異を起こさせた (Tanaka, A., et al., (1997a). Int. J. Radiat. Biol. 72, 121-127)。この処理を行った種子の2代目以降の後代 (100,000個体) の中から、茎の基部領域やロゼット葉の色素沈着を持たず、種子外被に褐色色素を持たないことを指標として、変化を生じた個体を候補変異株として選抜した。その後、これらの候補変異株を遺伝学的、生理学的、および分子生物学的などの方法に従って解析し、既知の変異を有さない2種のM2系統を単離した。これらは、対立遺伝子であり、tt19-1変異株およびtt19-2変異株と命名した。

【0050】

なお、エコタイプ、ランズバーグ株 (*Landsberg erecta*; Ler株) をTT19遺伝子の分子マッピングのために使用した。また、本明細書中の実施例において陰性対照として使用するast/ban-4変異株およびtt4 (C1) 変異株 (本明細書の以下において、単に「tt4変異株」と呼ぶ) はそれぞれ、以前に記載された方法にしたがって作出した (それぞれ、Tanaka, A., et al., (1997b). Genes Genet. Syst. 72, 141-148およびShikazono, N., et al., (1998). Genes Genet. Syst. 73, 173-179)。ast/ban-4変異株は、AST/BAN-4対立遺伝子を両方とも欠損するBAN遺伝子についてのヌル変異体であり、そしてtt4変異株は、TT4対立遺伝子を両方とも欠損するTT4遺伝子についてのヌル変異体である。これらの変異体のそれぞれは、Col株のバックグラウンドを有する。

【0051】

実施例2: tt19変異株の表現型特性

実施例1において作出した2種のtt19変異株 (tt19-1変異株およびtt19-2変異株) について視覚的観察を行ったところ、栄養増殖部分に関して、アントシアニン類由来の紫色の色素沈着は、tt19変異株の茎の基部領域では視覚的に観察されなかった (図2A、B)。

【0052】

続いて、2種のtt19変異株におけるアントシアニン含量を評価した。23℃、16時間-明光条件に調節した育成装置中で生長させた、約45日齢の野生型コロンビア (Col) 株、tt19-1変異株、tt19-2変異株およびtt4変異株の植物から、ロゼット葉 (100 mg) を採取した。それらを液体窒素条件下ですり潰し、そして5 mlの1% HCl / メタノールと混合した。暗条件下にて穏やかに懸濁しながら25℃で2晩抽出した後、Folch分配を行い、そして上層についてのOD₃₀₀₋₇₀₀を分光光度計 (DU530, Beckman, USA) を使用して測定した。平均値を、tt4変異株の場合に2回の実験から得た以外は、5回の独立した実験から得た。

【0053】

Col株において、530 nm付近での吸光度の鋭いピークが顕著だったが、一方でtt19変異株の両方ともで、対応するピークの大きな減少が観察された。平均OD₅₃₀値は、Col株、tt19-1変異株、tt19-2変異株、およびtt4変異株においてそれぞれ、 0.091 ± 0.011 、 0.041 ± 0.009 、 0.038 ± 0.004 、および 0.008 ± 0.001 であった。tt19変異株におけるアントシアニン蓄積は、温室などの強光条件下で培養することにより、いくらか増強された (データは示していない)。

【0054】

tt19変異株の種子外被は、Col株での褐色およびtt4変異株での黄色と比較して、熟成段階で淡-褐色を示した (図2C)。しかしながら、tt19変異株種皮の褐色化は、乾燥期間が長期化するにしたがって進行した。tt19変異株の種子外被は、長期間の乾燥の後によりやうやく、Col株の種子外被と同程度に暗色化した (図2D)。その他の表現型形質は、tt19変異株においては正常であるようであった。

【0055】

実施例3: ナリンゲニン処理

本実施例においては、シロイヌナズナ (Arabidopsis) の幼苗におけるアントシアニン色素沈着に対するナリンゲニンの添加の効果を調べた。

【0056】

糖類はシロイヌナズナ (Arabidopsis) の幼苗におけるアントシアニン色素沈着を誘導することが知られる (Tsukaya, H., et al., (1991). Plant Physiol.

97, 1414-1421)。ナリンゲニン処理実験の前に、アントシアニン蓄積の誘導のために適切なスクロースの濃度を決定した。

【 0 0 5 7 】

Col株の乾燥種子の表面を、70%EtOHで1分間、ついで0.05%Tween-20を含む次亜塩素酸ナトリウム溶液（約0.3%有効塩素）中で10分間滅菌し、そして滅菌蒸留水中で5回すすいだ。この種子を、0、1、2、5、10、または20%のいずれかの濃度のスクロースを含有する、MS/スクロース/アガー（0.8%）プレート上に播いた。4℃にて5日間の春化处理の後、このプレートを23℃に設定した連続明期条件の育成チャンバー中でインキュベートし、そして実体顕微鏡により毎日観察した（Stemi SV11, Zeiss, Germany）。結果を図3Aに示す。

【 0 0 5 8 】

Col株の幼苗において、スクロース濃度が5%まで上昇すればするだけ、上部胚軸領域（upper hypocotyls）および子葉の裏面（abaxial）と辺縁領域（marginal）で、著しく、アントシアニン色素沈着が深まった（図3A）。10%のスクロースでは発育の遅延が引き起こされ、そして20%のスクロースではCol株での発芽（germination）が阻害された（データは示していない）。2種のtt19変異株もまた、プレート上での発芽（germination）および幼苗発育が、10%より多いスクロースにより、遅延することを示した。したがって、5%のスクロースが、本実験において最適であると考えられた。

【 0 0 5 9 】

Col株、tt19-1変異株、tt19-2変異株、およびtt4変異株の乾燥種子の表面を、70%EtOHで1分間、ついで0.05%Tween-20を含む次亜塩素酸ナトリウム溶液（約0.3%有効塩素）中で10分間滅菌し、そして滅菌蒸留水中で5回すすいだ。それらを0.1 mMナリンゲニン（Shirley, B.W., et al., (1995). Plant J. 8, 659-671）を含むMS/スクロース/アガー（0.8%）プレート（5%の濃度のスクロースを含有）またはナリンゲニンを含まないプレート（5%の濃度のスクロースを含有）上に播いた。NohとSpalding（Noh, B., and Spalding, E.P. (1998). Plant Physiol. 116, 503-509）により記載されたように、50%EtOH中に溶解したナリンゲニン（Sigma）を、オートクレーブ処理した後にMS培地に添加した。4℃にて5日

間の春化处理の後、これらのプレートを23℃に設定した連続明期条件の育成チャンバー中でインキュベートし、そして実体顕微鏡により毎日観察した (Stemi SV 11, Zeiss, Germany)。結果を図3に示す。

【0060】

Col株の幼苗において、ナリンゲニンの添加により、アントシアニン色素沈着がある程度増大した (図3B)。5%スクロース培地での幼苗発育においていくつかの影響が観察されたが、以前に記載されたように (Kubasek, W.L., et al., (1992). Plant Cell 4, 1229-1236)、tt4変異株は、ナリンゲニン処理により、アントシアニン色素沈着を示した (図3F)。一方で、tt19変異株では、ナリンゲニン処理に関わらず、アントシアニンの蓄積は示されなかった (図3D)。これらの結果から、TT19遺伝子は、アントシアニン生合成経路におけるF3H反応から下流の段階において、機能することが示される (図1を参照)。

【0061】

実施例4：バニリン処理

一般に、シロイヌナズナ野生型種皮 (testa) の褐色には、主としてPA類の酸化が寄与する (Chapple, C.C.S., et al., (1994). Secondary metabolism in Arabidopsis. In Arabidopsis (Meyerowitz, E.M., and Somerville, C.R. eds). New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, pp. 989-1030)。バニリンは、酸性条件下でPA前駆体のモノマーユニットおよびPA類の末端ユニット (terminal units) と反応し、結果として蓄積部位における赤色色素の沈着が生じる (Deshpande, S.S., et al., (1986). Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 24, 401-449)。本実施例においては、これらのPA前駆体の存在および／または分布を決定するため、バニリン処理を未成熟tt19変異株の種子において行った。

【0062】

本質的にはDebeaujonら (2000) の方法にしたがって、バニリン処理を行った。DAF10までのサンプルを、全組織標本観察により研究した。DAF10の後に、バニリン処理種子由来の種子外被部分を解剖学的に単離し、そして内種皮層を顕微鏡を用いて観察した (Axioskop, Zeiss, Germany)。結果を図4に示す。

【0063】

開花後日数 (DAF) 1において、Col株およびtt19の両方において赤色化が認識され、そして両者の間で著しい変化は観察されなかった (図4A、B)。しかしながら、DAF3あたりから後には、Col株の種子とtt19変異株の種子との間での赤色色素の沈着パターンには、明らかな違いがあった (図4C～F)。最も顕著な相違は、DAF5において観察された (図4C、D)。すなわち、Col株の種皮 (testa) においては、赤色色素が大型の中央部液胞中に蓄積し、それらのそれぞれは、内種皮 (endothelium) 層の細胞内部で、完全に拡張したようであった (図4C)。

【0064】

一方で、tt19変異株の種皮 (testa) においては赤色色素が明らかに検出されたが、それらの空間的存在 (occurrence) は、Col株におけるそれよりも限定的であり、そして内種皮層のそれぞれの細胞内でのいくつかのより小さな液胞内に赤色色素が蓄積した (図4D)。赤色色素の分布における相違が、DAF9～10まで連続的に検出され、その後は、おそらくは種子外被の硬化のためであると思われるが、全組織観察は困難であった。そのように硬化した種子外被におけるPA前駆体の分布を調べるため、本発明者らは、種子外被切片 (segment) を解剖学的に単離し、そしてその最も内側の (内皮endothelium) 層を観察した。DAF17での例を、図4EおよびFにおいて示す。Col株において、赤色色素沈着は非常に弱く、その構成細胞の周縁で観察された (図4E)。対照的に、tt19変異株では、赤色色素は、内種皮細胞のそれぞれの内部に完全に満たされた (図4F)。

【0065】

実施例5: TT19遺伝子の分子マッピング

本実施例においては、野生型Lerをtt19-1変異株またはtt19-2変異株と交配したことから生じたF2個体を使用して、TT19遺伝子の分子マッピングを行った。

【0066】

具体的には、Col株のバックグラウンドを有するtt19-1変異株およびtt19-2変異株と、野生型Landsberg erecta (Ler) 株とを交配させてF2個体を得た場合、理想的には、一つのマーカーに関してCol型とLer型との比率を調べると、Col型:Ler型=1:1に近くなる。しかしながら、これらのF2個体をtt19変異表現型をマーカーとして選別すると、このマーカーは必ずCol型となるため、ゲノム上でT

TT19遺伝子座に近づくにつれ、Ler型に対するCol型の比率が上昇することになる。この性質を利用して、TT19遺伝子座の可能性のある領域を徐々に特定していった。

【0067】

tt19-1変異株およびtt19-2変異株と、野生型Ler株との交配から、それぞれ、tt表現型を示す45のF2植物および103のF2植物を得た。製造者の指示に従ってDNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) を使用することにより、ゲノムDNAをロゼット葉から抽出した。CAPSマーカーおよびSSLPマーカーとの連鎖との関連で、標準的な方法にしたがってそれらのF2ゲノムDNAを使用して、分子マッピングを行った (Bell, C.J., and Ecker, J.R. (1994). Genomics 19, 137-144)。

【0068】

tt19-1変異株の対立遺伝子については、RIマップ上での染色体5の20.6 cM、23.7 cM、および25.3 cMのDNAマーカーを用いた場合、それらの組換え頻度が徐々に減少することが示され、そしてTT19遺伝子は29.5 cM付近に位置した。一方で、42.2 cMおよび50.5 cMマーカーでの組換え値からは、TT19遺伝子は35.5 cM付近に位置した。加えて、TT19遺伝子についてのこれら2つの可能性のある位置の間の領域における組換えは、45のF2個体間では決して観察されなかった。この現象は、イオンビームにより誘導された変異株においてしばしば見いだされ、そしてこの現象によりtt19-1変異株中では、29.5 cMおよび35.5 cM付近を切断点とする逆位が生じているという仮説が導かれる。

【0069】

ついで、tt19-2変異株の対立遺伝子のマッピングを行った。tt19-2変異株の対立遺伝子については、35 cM付近の染色体部位中への組換え値が103のF2個体間で徐々に減少した。これらの結果により、TT19遺伝子は35 cM領域の周辺に位置し、そしてtt19-1変異株においては推定される大型の逆位の切断点の一つが、TT19遺伝子座と一致する、と推論することが可能になる。

【0070】

上述した推論に基づいて、本発明者らはまず第一に、tt19-2変異株の遺伝子座のマップ位置が限定される5つのBACクローンまたはP1クローンについてアノテ-

ションに焦点を絞った。tt19変異株の主要な特徴は、アントシアニン類を欠損しているかまたはそのレベルが減少していることであるため、TT19遺伝子はアントシアニン類の合成および／または蓄積に関与する可能性がある。まさに、いくつかのTT19候補物を限定された5種のBACクローンまたはP1クローンで見いだすことができた。

【0071】

次に、tt19-2変異株の対立遺伝子からのマッピングデータに基づいて、本発明者らは、最も可能性のある候補物と考えられたP1クローンMKP11にあるグルタチオンS-トランスフェラーゼ (GST) -様遺伝子と推定される遺伝子の解析を始めた。

【0072】

TT19遺伝子の候補として最も可能性の高いGST-様遺伝子に関して、その全体領域をカバーする4組のプライマーを推定TT19遺伝子座付近で設計した；

TT19-f0 (5'-GAG AAC CCC AAA AAC GTC AC-3' ; SEQ ID NO: 3) およびTT19-r0 (5'-GTT GTG AGG GTT GGG TAG AA-3' ; SEQ ID NO: 4) ；

TT19-f1 (5'-GTG GTT GTT GGG AAG AGA AG-3' ; SEQ ID NO: 5) およびTT19-r1 (5'-CGA TGG CTC GTG ATT CTT AG-3' ; SEQ ID NO: 6) ；

TT19-f2 (5'-GGT CAA GTT CCA GCC ATA GA-3' ; SEQ ID NO: 7) およびTT19-r2 (5'-AGC GAG AGG AAA GTG GAA CA-3' ; SEQ ID NO: 8) ；そして

TT19-f3 (5'-CCC TCA TTA GGC CAA GAG AA-3' ; SEQ ID NO: 9) およびTT19-r3 (5'-GAG CTT ATG TGG GGA AAG TC-3' ; SEQ ID NO: 10) 。これらのプライマーは、2種類のtt19変異株のゲノムDNAに対して、GST-様遺伝子が破壊されている場合には増幅することができず、破壊されていない場合には増幅することができるように設定した。

【0073】

これらのプライマーの組み合わせを使用して、PCRを行った。PCR反応は、最初の変性段階を95℃にて10分間、その後94℃にて0.5分間、57℃にて0.5分間そして72℃にて1分間を1サイクルとして40サイクル、そして72℃にて7分間の最後の伸長段階、からなるプログラムにより行った。増幅フラグメントは、1.5%アガロ

ースゲル電気泳動で分離した。その結果、4種の断片のうち2種は、tt19-1変異株では増幅されなかったことから、tt19-1変異株のこれらの非-増幅DNA領域においては大型の逆位の切断点と推定されるものが存在することが示唆された。

【0074】

実施例6: TT19遺伝子の分子クローニング

本実施例においては、増幅フラグメントの回収、精製および配列決定により、TT19遺伝子の分子クローニングを行った。

【0075】

2種のtt19変異遺伝子座における再構成された場所を含むDNAフラグメントを単離するため、TAIL-PCR (thermal asymmetric interlaced-PCR) (Liu, Y.-G., and Whittier, R.F. (1995). Genomics 25, 674-681) を行った。

【0076】

まず、2セットの3種の特異的ネステッドプライマー

MKP11-R4, 5'-ATC AAG TAC CCC ATC GCC GGC ATG T-3' (SEQ ID NO: 11) ; MKP11-R5, 5'-GGC ATG TGC GTC AAA TCA GCC ATA G-3' (SEQ ID NO: 12) ; MKP11-R6, 5'-AAC CGG TTC GAA GAA AGC CGG TTA T-3' (SEQ ID NO: 13) ;そして

MKP11-F7, 5'-ATA TGG ACA GGT AAC AGC AGC TTG TC-3' (SEQ ID NO: 14) ; MKP11-F8, 5'-GCA GCT TGT CCA CAA AGA GTC TTG CT-3' (SEQ ID NO: 15) ; MKP11-F9, 5'-GCT TTG TTT TCT CGA GAA AGG AAT TG-3' (SEQ ID NO: 16) ;

のそれぞれを、tt19-1変異遺伝子座の逆位DNAの2種の結合部配列を単離するために使用した。

【0077】

3種のオリゴヌクレオチド;

bCC5-8-R1 (5'-GAC GTC ACA TTT CTC GCC TAA CCT-3' ; SEQ ID NO: 17) 、 bCC5-8-R2 (5'-GAG GGG TTG GGC CAG AAC GTT GAA-3' ; SEQ ID NO: 18) 、 および bCC5-8-R3 (5'-CGA TGG CTC GGT GCT CTA GAG ACT-3' ; SEQ ID NO: 19)

を、tt19-2変異株における特異的ネステッドプライマーとして使用した。

【0078】

Liuら (Liu, Y.-G., et al., (1995a). Plant J. 8, 457-463) により記載さ

れた配列に基づいて、2種の任意の縮重プライマー (AD2 (5'-NGT CGA SWG ANA W GA A-3'; SEQ ID NO: 20) およびAD3 (5'-WGT GNA GWA NCA NAG A-3'; SEQ ID NO: 21)) を合成した。もう一つのADプライマー (AD1) の配列は、5'-GTN CGA S WC ANA WGT T-3' (SEQ ID NO: 22) であった。ここで「S」はGまたはCを示し、「W」はAまたはTを示し、そして「N」はいずれかの塩基であることを示す。

【0079】

5回の高ストリンジェントなサイクルにおけるアニーリング温度を65℃にし、2.5分間のそれぞれの伸長段階を3分間にすること以外はLiuら (1995a、上述) の方法に従って、特異的ネステッドプライマーセットおよび所定のADプライマーを使用して、エッペンドルフMastercyclerグラジエント (Eppendorf) 中でTAIL-PCRサイクルを行った。上述したように、PCR産物を分画し、精製し、そして配列決定した。

【0080】

得られたTAIL-PCR産物の配列決定から、GST-様遺伝子の下流領域が、染色体5でのBAC F18022の配列と完全に相補的な配列と、逆方向で結合し、フィラー (filler) -DNA-様13 bp配列を境界部に有することが示された (図5A)。フィラー-DNA-様配列 (13 bp) の起源は、それと同一の配列がシロイヌナズナゲノムの全体にわたり分散されているため、明らかではなかった。逆位のもう一つの再結合点もまた、TAIL-PCRにより決定し、そしてそれを配列決定し、F18022およびMKP11配列を含有するフラグメントが検出され、これにも7 bpの境界部のフィラー-DNA-様断片が伴った (図5A)。

【0081】

したがって、tt19-1変異株においては、F18022ならびにMKP11上のGST-様遺伝子の第2イントロンを切断点とする逆位が生じていると、本発明者らは結論付けた。この逆位のサイズは、シロイヌナズナゲノムデータベースに基づいて、長さ約1000 kbと推定された。TAIRにより発行されたアノテーションにより、BAC F18022上の切断点には、遺伝子は存在しないことが示される。さらに、F18022中の6 bpフラグメント (TAGAAA) が、逆位の境界部において逆向きに重複されたことが示された。

【 0 0 8 2 】

PCR解析を、tt19-2変異株におけるGST-様遺伝子座についても行った。f1プライマーとr1プライマーとを使用すると、増幅は観察されず、このことからtt19-2変異株がf1-r1領域での切断点を伴うようなDNA再構成を行った可能性があることが示される。TAIL-PCRにより、翻訳開始部位を+1と定義した場合、-53ヌクレオチドがさらに16.7 kb上流の領域と再結合されたことが示された（図5B）。配列解析では、再結合部位からGST-様遺伝子のエクソン3の60 bp下流までの領域ではその他の変異を見いだされなかった。GST-様遺伝子座から削除されたDNA領域の一部は、tt19-2変異株ゲノム中にてPCRにより増幅され、そしてそれらの配列は、野生型の配列と完全に同一であった。

【 0 0 8 3 】

したがって、長さ16.7 kbのフラグメントは、転座部位は本研究では検出されなかったが、tt19-2変異株のその他のゲノム領域中に転座されるようである。tt19-1変異株の場合と同様に、シロイヌナズナのアノテーションにより、tt19-2変異株の対立遺伝子の16.7 kbのフラグメントの上流切断点上には、遺伝子が存在しないことが示される。

【 0 0 8 4 】

実施例7：系統発生的解析

tt19変異株の両方（すなわち、tt19-1変異株およびtt19-2変異株）がGST-様遺伝子中の変異を有するため、本発明者らは、それがTT19遺伝子であると予想した。この予想を確認するため、Clustal W ver. 1.7 (Thompson, J.D., et al., (1994)、上述) を使用して、マルチプルアラインメントを行った。PHYLIP ver. 3.57 (Felsenstein, J. (1995). PHYLIP (Phylogeny inference package) version 3.57c. University of Washington Press, Seattle) を使用して、neighbor-joining法 (Saitou, N., and Nei, M. (1987). Mol. Biol. Evol., 4, 406-425) を行った。結果を図6および図7に示す。

【 0 0 8 5 】

野生型TT19遺伝子の推定アミノ酸配列は、シロイヌナズナESTクローンH36860のアミノ酸配列と約70%、およびベチュニアGST遺伝子、AN9のアミノ酸配列と、

約50%の高い同一性を示す（図6A）。いくつかの植物GSTを使用する系統発生的解析から、TT19は最初にH36860と、その後AN9と、クラスター形成されたことが示された（図6B）。

【0086】

実施例8：野生型TT19遺伝子の機能解析

本実施例においては、野生型TT19遺伝子をtt19変異株に導入することにより、tt19変異株の表現型が野生型に回復するかどうかを確認した。

【0087】

野生型TT19遺伝子をP1クローンMKP11 (Liu, Y.-G., et al., (1995b). Plant J. 7, 351-358) から単離した。TT19遺伝子の真性のプロモーターを含むTT19遺伝子を含有するKpnI/SacIフラグメント（約2.4 kb）を、上述したようにアガロースゲルから分画・回収し、同一の酵素により消化したpUC19中にサブクローン化した。ベクターアームとインサートとの境界部分を配列決定した後、ゲノムTT19遺伝子を単離し、そしてバイナリーベクターpBI101中に導入した (Jefferson, R.A., et al., (1987). EMBO J. 6, 3901-3907)。

【0088】

境界領域を含むインサートの配列を確認した後、バイナリーベクターを、エレクトロポレーションにより、Agrobacterium GV3101中にトランスフォームした。バイナリーベクターをもつAgrobacteriumクローンをアグロバクテリウム法の改変方法であるフローラル・ディップ法 (Clough and Bent, 1998、上述) によりtt19変異株に感染させ、そしてT1幼苗をえた。カナマイシン (50 mg/l) およびクラフォラン (Claforan) (166 mg/l) を用いてT1種子をスクリーニングした後、形質転換体を生育させ、そしてそれらの表現型を主としてフラボノイド色素沈着の関連で観察した。

【0089】

tt19変異株系統のいずれかに由来する5種の独立した形質転換体植物 (tt19/AU:TT19系統と命名) のすべてで、幼苗へのアントシアニン蓄積 (図7A) ならびに熟成ステージでの種皮 (testa) への褐色色素沈着 (図7B) が野生型レベルまで回復された。これは、TT19遺伝子の破壊がtt19変異株のフラボノイド欠損表現型

の原因となることを示す。

【0090】

実施例9: TT19およびその他のフラボノイド遺伝子の発現

本実施例においてはまず、TT19遺伝子に対応するcDNAクローンをGenBankデータベース中で検索した。mRNAに対して非常に高い相同性を有する1つのクローン169M6を見いだした。このcDNAクローンの配列決定により、それが、45 bpの5' 非-翻訳領域および272 bpの3' 非-翻訳領域およびポリ-Aテールを伴う、TT19遺伝子のコード領域（本明細書中では、SEQ ID NO: 1）と完全に同一の配列からなることを見いだした。この結果に基づいて、169M6はTT19遺伝子の転写に由来すると考えることができた。さらに、tt19-2変異株の対立遺伝子における切断点は、推定転写開始部位から9 bp上流に位置していることが示された（図5B）。

【0091】

TT19遺伝子が2種のtt19変異株中で発現されるかどうかを決定するため、温室内で6週間生長させたロゼット葉由来の全RNAを使用して、逆転写（RT）-PCRを行った。

【0092】

まず、温室内で生長させた6週齢の植物の様々な組織から、RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) を使用して全RNAを抽出した。RNase-不含DNaseセット (Qiagen) を製造者のプロトコルにしたがって使用することにより、ゲノムDNAの混入を防止した。幼苗および根からのRNAの調製のために、連続明期の条件の23℃のインキュベーター中、幼苗をMS/スクロース（1%）/アガー（0.8%）プレート上で垂直方向にそれぞれ5および10日間生育させ、そしてRNA抽出を上述したように行った。

【0093】

次に、TT19およびその他のフラボノイド遺伝子の発現に関して、500 ngの全RNAを使用し、Takara RNA LA PCR Kit (ver. 1.1, Takara) を製造者のプロトコルにしたがって用いて、RT-PCRを行った。PCRプログラムは、最初の変性段階を95℃にて2分間、その後94℃にて0.5分間、57℃にて0.5分間そして72℃にて1.5分間を1サイクルとして30サイクル、そして72℃にて7分間の最後の伸長段階からなる

。ホットスタート法をすべてのRT-PCR反応に行った。

【0094】

TT19発現について、TT19-RT/f2 (5'-GAA CAT CTT CTT CGT CAG CCA TTT GGT CAA-3'; SEQ ID NO: 23) およびTT19-RT/r1 (5'-GGT TCT TCA GAT CAT CAT AAA TTG GAG CTA-3'; SEQ ID NO: 24) を、特異的プライマーとして使用した。Nesiら (Nesi, N., et al., (2000). Plant Cell 12, 1863-1878) により報告されたプライマー対を使用して、伸長因子1 α A4 (EF1 α A4) の発現を内部標準として決定した。これらのPCR産物のサイズは、それぞれ548 bpおよび709 bpであった。

【0095】

カルコンシンターゼ (CHS)、フラボノイド3'-ヒドロキシラーゼ (F3'H)、およびジヒドロフラボノール4-リダクターゼ (DFR) について、ここで使用したプライマーは、DFR-リバースプライマーを除き、Nesiら (2000、上述; Nesi, N., et al., (2001). Plant Cell 13, 2099-2114) によるプライマーと同一であり：

CHSについてCHS-UP; 5'-ATG GCT GGT GCT TCT TCT TTG G-3' (SEQ ID NO: 25) およびCHS-RP; 5'-TCT CTC CGA CAG ATG TGT CAG G-3' (SEQ ID NO: 26) ;

F3'HについてF3'H-UP; 5'-CAT GGC AAC TCT ATT TCT CAC-3' (SEQ ID NO: 27) およびF3'H-RP; 5'-CGT CAC CGT CAA GAT CAG TTC C-3' (SEQ ID NO: 28) ;
および

DFRについてDFR-UP; 5'-ATG GTT AGT CAG AAA GAG ACC G-3' (SEQ ID NO: 29) およびDFR-RT/r1; 5'-GAC ACG AAA TAC ATC CAT CCT G-3' (SEQ ID NO: 30)
それぞれのPCR産物のサイズは、712 bp、851 bp、および497 bpの長さであった。

【0096】

カルコンイソメラーゼ (CHI)、フラバノン3-ヒドロキシラーゼ (F3H)、およびロイコアントシアニジンジオキシゲナーゼ (LDOX) 発現について、特異的プライマーを以下の様に設計した：

CHIについてCHI-f1 (5'-CTC AAC AAT GTC TTC ATC CAA CGC CT-3'; SEQ ID NO: 31) およびCHI-r1 (5'-CGA AAA CGC AAC CGT AAG AGA G-3'; SEQ ID NO: 32)
;

F3HについてF3H-f1 (5'-GCC GGA GAG TCT AAG CTC AAC T-3' ; SEQ ID NO: 33)
) およびF3H-r1 (5'-CCA CGG CCT GAT GAT CAG CAT T-3' ; SEQ ID NO: 34) ;
LDOXについてLDOX-f2 (5'-GAT GGT TGC GGT TGA AAG AGT T-3' ; SEQ ID NO: 35)
) およびLDOX-r2 (5'-AAA GCG CTT ACA TCG GTG TGA G-3' ; SEQ ID NO: 36) 。
PCR産物のサイズは、それぞれ535 bp、808 bp、そして714 bpの長さであった。

【 0 0 9 7 】

予想されたように、単一のバンドがCol株RNAでは増幅されたが、一方でtt19-1
変異株およびtt19-2変異株由来のRNAサンプルでは、バンドは検出されなかった
(図8)。したがって、TT19遺伝子の発現は、2種のtt19変異株中では破壊された
ことが示された。

【 0 0 9 8 】

Col植物の様々な器官におけるTT19遺伝子の発現パターンもまた、調べた。TT19
遺伝子の発現は、幼苗、根、茎、葉、花芽、花、および発育中の長角果 (siliq
ue) を含む、試験したすべての器官において検出された (データは示していない
)。このことから、TT19遺伝子は、植物全体レベルで定常的に発現していること
が示される。さらに、RT-PCRはまた、TT19遺伝子発現の破壊が、CHS、CHI、F3H
、F3'H、DFR、およびLDOXなどの、その他のフラボノイド構造遺伝子の発現に影
響を与えないことを示した (図8)。

【 0 0 9 9 】

実施例10: tt19 ban二重変異株解析

本実施例においては、tt19遺伝子とバニユルス (BANYULS ; BAN) (Albert, S.
, et al., (1997). Plant J. 11, 289-299) の二重変異株を作出し、その解析を
通じて、TT19遺伝子の作用機序を明らかにすることを目的として行った。

【 0 1 0 0 】

バニユルス (BANYULS ; BAN) は、シロイヌナズナのPA生合成経路に特異的に関
与する酵素の一つをコードし (Xie et al., 2003、上述 ; 図1参照)、BAN遺伝子
の機能喪失変異は、結果として種子外被にフラバン3-オール類を生じさせなかつ
た (Devic, M., et al., (1999). Plant J. 19, 387-398)。予備的実験により
、アントシアニンスポットを有する種皮 (testa) (ast) 変異株 (Tanaka et al

., 1997b、上述) が、ban変異体により相補されないことが示された。このことから、astがbanの対立遺伝子であり (Winkel-Shirley, 2001、上述)、そしてBANにおいて49 bp (+114~162 nt) の欠失を生じ、その結果ヌル変異体を生じることが示された。したがって、本明細書の以下において、astはban-4と呼ばれる。tt19およびbanのあいだの相互作用を研究するため、tt19対立遺伝子のいずれかとban-4とを有する二重変異株を構築し、そしてその表現型を特定した。

【0101】

tt19 ban二重変異株の作出は、次のように行う。まずtt19変異株とban変異株とをかけ合わせるにより作出されるF1個体を作成する。このF1個体は、すべての個体がtt19遺伝子座およびban遺伝子座についてともにヘテロであるという特徴を有する。ついで、このF1個体の自殖によりF2個体を作成し、これらのF2個体の中から、理論的には6.25%含まれるtt19 ban二重変異株を、TT19およびBANの塩基配列に基づいて選抜する。

【0102】

アントシアニン類の色素沈着は、tt19 ban二重変異株の葉および茎においては観察されなかった。二重変異株の未成熟種子外被において、非常に漏出性の (leaky) アントシアニンの着色が認識されたが、顕著なそして早発の蓄積は観察されなかった (図9A)。これらの結果から、植物全体レベルで、tt19は、アントシアニン蓄積に関してbanに対して上位性のものであったことが示される。バニリン分析により、banの場合 (Devic et al., 1999、上述) および本明細書中で使用したban-4の場合 (データは示していない) と同様に、PA前駆体は二重変異株の未成熟種子外被において決して検出されないことが示された。熟成段階での種子色に関して、banは灰色がかった曇った褐色を示し、tt19は淡-褐色を、そして二重変異株は淡い灰色がかった淡-褐色を示した (図9B)。追加的な乾燥期間の後の二重変異株においては、成熟後の種子色の暗色化を引き起こす (図2D) tt19の特徴の一つが、明らかに欠損しており、そして種子色における変化が何も観察されなかった (図9C)。

【0103】

実施例11: ペチュニアAN9によるtt19変異の機能的相補

本実施例においては、TT19の機能を決定するため、TT19の推定ホモログであるペチュニアAN9を、CaMV 35Sプロモーターのもとで制御し、そしてこのコンストラクトをtt19変異株中に導入することにより、tt19変異株における色素蓄積の欠損を、ペチュニアにおけるホモログであるAN9遺伝子により相補できるかどうかについて検討した。

【0104】

ペチュニア (V26株) AN9 cDNAを、花芽の全RNAから上述したRT-PCRにより増幅した。ペチュニアAN9を増幅するために、AN9-5' (5'-GGA TCC ATG GTT GTG AAA GTG CAT GG-3'; SEQ ID NO: 37) およびAN9-3' (5'-GAG CTC GTC CCG TAC TCC A CA ACA AT-3'; SEQ ID NO: 38) をRT-PCRにおけるプライマーとして使用した。アニーリング温度が55℃である以外は実施例9に上述したようにして、RT-PCRを行った。TA-クローニング産物を配列決定することにより、すべてのAN9 cDNAクローンのエクソン3にヌクレオチド置換が見いだされ、その結果刊行物に記載された配列と比較すると、1アミノ酸の置換が導かれていた (Val⁸⁰→Asp⁸⁰)。

【0105】

次に、実施例8に上述したようにして、プラスミドをBamHIおよびSacIにより消化し、そしてインサートを、pUC19中にサブクローン化した。対照実験のために、ESTクローン169M6のインサートをSalIおよびNotIで消化することにより回収し、それぞれがBamHI-認識部位およびSacI-認識部位を含む2種の特異的アダプターを用いてライゲーションし、そしてpUC19中にサブクローン化した。ベクターアームとインサートとの境界部分を配列決定した後、2種類のcDNA (TT19 cDNAおよびAN9 cDNA) を単離し、そしてバイナリーベクタpBI121中に導入し (Jefferson, R.A., et al., (1987)、上述)、相補解析を行った。境界領域を含むインサートの配列を確認した後、2種類のバイナリーベクターを、エレクトロポレーションにより、Agrobacterium GV3101中に別々にトランスフォームした。バイナリーベクターをもつAgrobacteriumクローンをアグロバクテリウム法の改変方法であるフローラル・ディップ法 (Clough and Bent, 1998、上述) によりtt19変異株に感染させ、そしてT1幼苗をえた。カナマイシン (50 mg/l) およびクラフォラン (Claforan) (166 mg/l) を用いてT1種子をスクリーニングした後、形質転換

体を生育させ、そしてそれらの表現型を主としてフラボノイド色素沈着の関連で観察した。

【0106】

すべての生存T1幼苗 (*tt19/35S:AN9*系統) は、選択培地上でアントシアニン色素沈着を示した (図7C)。しかしながら、熟成段階での種子色は、すべてのトランスジェニック植物において、*tt*表現型のままであった (図7D)。

【0107】

RT-PCRは、これらのT1植物中の発育中の長角果 (*silique*) において、AN9が十分に発現していることを示した (データは示していない)。35S:*TT19* cDNAコンストラクトを用いた対照実験では、淡-褐色の種子を有するいくつかの植物がこのトランスジェニック系統中に含まれるが (表1)、*TT19*が*CaMV 35S*プロモーター制御下においても*tt19*の種子色を相補することが確認された (図7D)。

【0108】

【表1】

表1: 真性プロモーター制御-野生型 *TT19* (*1119/AU:TT19* 株)、35S *CaMV* プロモーター制御-*TT19* cDNA (*1119/35S:TT19* 株)、および 35S *CaMV* プロモーター制御-ペチュニア *AN9* cDNA (*1119/35S:AN9* 株) を使用する、トランスジェニック *1119* 植物 (T1 植物) における *1119* 表現型の相補

系統	全数	アントシアニンを有する幼苗の数	種子色レベルによる個体数		
			野生型レベル	中間	<i>1119</i> レベル
<i>1119/AU:TT19</i>	5	5	5	0	0
<i>1119/35S:TT19</i>	15	15	8	4	3
<i>1119/35S:AN9</i>	18	18	0	0	18

【0109】

【発明の効果】

本発明は、上述したように植物体細胞内の液胞にフラボノイドを蓄積させる機能を有する*TT19*遺伝子を提供する。*TT19*遺伝子のこのような特徴を利用して、*TT19*遺伝子の活性を調節することにより、植物の最も代表的な色素であり、ポリフェノール類で機能性色素としても注目されているアントシアニン色素量を制御す

ることや、抗酸化作用などで注目されているタンニン量を制御させることができる。特に、植物体内での例えばプロモーターを活性化することなどにより、TT19 遺伝子の発現を向上させることにより、アントシアニンの液胞への蓄積量を高めたり、タンニンの液胞内蓄積量を高めることができる。また、細胞培養などによるバイオリアクターにTT19遺伝子を使用することにより、色素やポリフェノール類を含むフラボノイドの合成・生産が可能となる。

【 0 1 1 0 】

【配列表】

<110> Japan Atomic Energy Research Institute

<120> 植物色素蓄積遺伝子 (A Gene For Accumulating Pigments Of A Plant)

<130> 030385

<160> 33

<210> 1

<211> 645

<212> DNA

<213> Arabidopsis thaliana

<220>

<223> Sequence of TT19 gene cDNA

<400> 1

```
atggttgtga aactatatgg acaggtaaca gcagcttgtc caciaagagt cttgctttgt 60
tttctcgaga aaggaattga atttgagatt attcatatcg atcttgatac atttgagcaa 120
aaaaaaccag aacatcttct tcgtcagcca tttgggtcaag ttccagccat agaagatgga 180
gatttcaagc tttttgaatc acgagccatc gcgagatact acgctaccaa gttcgcggac 240
caaggcacga accttttggg caagtctcta gagcaccgag ccattcgtgga ccagtgggct 300
```

gacgtggaga cctattactt caacgttctg gcccaacccc tcgtgattaa cctaatacatc 360
 aagcctaggt taggcgagaa atgtgacgtc gttttggtcg aggatctcaa agtgaagcta 420
 ggagtggctt tggacatata caataaccgg ctttcttcga accgggtttt ggctggtgaa 480
 gaattcacta tggctgattt gacgcacatg ccggcgatgg ggtacttgat gagtataacc 540
 gatataaacc agatgggttaa ggctcggggg agttttaacc ggtgggtggga agagatttcg 600
 gatagaccgt cttggaagaa gcttatgggtg ctggctggtc actga 645

<210> 2

<211> 214

<212> PRT

<213> Arabidopsis thaliana

<220>

<223> Putative amino acid sequence of TT19

<400> 2

Met	Val	Val	Lys	Leu	Tyr	Gly	Gln	Val	Thr	Ala	Ala	Cys	Pro	Gln	Arg
			5					10						15	
Val	Leu	Leu	Cys	Phe	Leu	Glu	Lys	Gly	Ile	Glu	Phe	Glu	Ile	Ile	His
			20					25						30	
Ile	Asp	Leu	Asp	Thr	Phe	Glu	Gln	Lys	Lys	Pro	Glu	His	Leu	Leu	Arg
			35					40						45	
Gln	Pro	Phe	Gly	Gln	Val	Pro	Ala	Ile	Glu	Asp	Gly	Asp	Phe	Lys	Leu
			50					55						60	
Phe	Glu	Ser	Arg	Ala	Ile	Ala	Arg	Tyr	Tyr	Ala	Thr	Lys	Phe	Ala	Asp
			65					70						75	
Gln	Gly	Thr	Asn	Leu	Leu	Gly	Lys	Ser	Leu	Glu	His	Arg	Ala	Ile	Val
			85					90						95	
Asp	Gln	Trp	Ala	Asp	Val	Glu	Thr	Tyr	Tyr	Phe	Asn	Val	Leu	Ala	Gln
			100					105						110	

Pro Leu Val Ile Asn Leu Ile Ile Lys Pro Arg Leu Gly Glu Lys Cys

115

120

125

Asp Val Val Leu Val Glu Asp Leu Lys Val Lys Leu Gly Val Val Leu

130

135

140

Asp Ile Tyr Asn Asn Arg Leu Ser Ser Asn Arg Phe Leu Ala Gly Glu

145

150

155

160

Glu Phe Thr Met Ala Asp Leu Thr His Met Pro Ala Met Gly Tyr Leu

165

170

175

Met Ser Ile Thr Asp Ile Asn Gln Met Val Lys Ala Arg Gly Ser Phe

180

185

190

Asn Arg Trp Trp Glu Glu Ile Ser Asp Arg Pro Ser Trp Lys Lys Leu

195

200

205

Met Val Leu Ala Gly His

210

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Primer designated as TT19-f0, which is used for amplifying TT19 genomic region by PCR.

<400> 3

gagaacccca aaaacgtcac

20

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Primer designated as TT19-r0, which is used for amplifying TT19 genomic region by PCR.

<400> 4

gttgtgaggg ttgggtagaa 20

<210> 5

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Primer designated as TT19-f1, which is used for amplifying TT19 genomic region by PCR.

<400> 5

gtggttggttg ggaagagaag 20

<210> 6

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Primer designated as TT19-r1, which is used for amplifying TT19 genomic region by PCR.

<400> 6

cgatggctcg tgattcttag 20

<210> 7

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Primer designated as TT19-f2, which is used for amplifying TT19 genomic region by PCR.

<400> 7

ggtcaagttc cagccataga 20

<210> 8

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Primer designated as TT19-r2, which is used for amplifying TT19 genomic region by PCR.

<400> 8

agcgagagga aagtggaaca 20

<210> 9

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Primer designated as TT19-f3, which is used for amplifying TT19 genomic region by PCR.

<400> 9

ccctcattag gcccaagagaa 20

<210> 10

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Primer designated as TT19-r3, which is used for amplifying TT19 genomic region by PCR.

<400> 10

gagcttatgt ggggaaagtc 20

<210> 11

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Nested primer designated as MKP11-R4, which is used in TAIL-PCR for isolating two junction sequences of inverted DNA in ttl9-1 mutant.

<400> 11

atcaagtacc ccatcgccgg catgt 25

<210> 12

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Nested primer designated as MKP11-R5, which is used in TAIL-PCR for isolating two junction sequences of inverted DNA in tt19-1 mutant.

<400> 12

ggcatgtgcg tcaaatacgc catag 25

<210> 13

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Nested primer designated as MKP11-R6, which is used in TAIL-PCR for isolating two junction sequences of inverted DNA in tt19-1 mutant.

<400> 13

aaccggttcg aagaaagccg gttat 25

<210> 14

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Nested primer designated as MKP11-F7, which is used in TAIL-PCR for isolating two junction sequences of inverted DNA in tt19-1 mutant.

<400> 14

atatggacag gtaacagcag cttgtc 26

<210> 15

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Nested primer designated as MKP11-F8, which is used in TAIL-PCR for isolating two junction sequences of inverted DNA in ttl9-1 mutant.

<400> 15

gcagcttgtc cacaagagt cttgct 26

<210> 16

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Nested primer designated as MKP11-F9, which is used in TAIL-PCR for isolating two junction sequences of inverted DNA in ttl9-1 mutant.

<400> 16

gctttgtttt ctcgagaaag gaattg 26

<210> 17

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Nested primer designated as bCC5-8-R1, which is used in TAIL-PCR in tt19-2 mutant.

<400> 17

gacgtcacat ttctgccta acct 24

<210> 18

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Nested primer designated as bCC5-8-R2, which is used in TAIL-PCR in tt19-2 mutant.

<400> 18

gaggggttgg gccagaacgt tgaa 24

<210> 19

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Nested primer designated as bCC5-8-R3, which is used in TAIL-PCR in tt19-2 mutant.

<400> 19

cgatggctcg gtgctctaga gact 24

<210> 20
<211> 16
<212> DNA
<213> Artificial sequence
<220>
<223> Degenerate AD primer (AD2) for amplifying the rearranged DNA segments.

<400> 20
ngtcgaswga nawgaa 16

<210> 21
<211> 16
<212> DNA
<213> Artificial sequence
<220>
<223> Degenerate AD primer (AD3) for amplifying the rearranged DNA segments.

<400> 21
wgtgnagwan canaga 16

<210> 22
<211> 16
<212> DNA
<213> Artificial sequence
<220>
<223> Another AD primer (AD1) for amplifying the rearranged DNA segment s.

<400> 22

gtncgaswca nawgtt 16

<210> 23

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Primer designated as TT19-RT/f2 which is used in RT-PCR method.

<400> 23

gaacatcttc ttcgtcagcc atttggtaa 30

<210> 24

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Primer designated as TT19-RT/r1 which is used in RT-PCR method.

<400> 24

ggttcttcag atcatcataa attggagcta 31

<210> 25

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Primer designated as CHS-UP which is used in RT-PCR method.

<400> 25

atggctggtg cttcttcttt gg 22

<210> 26

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Primer designated as CHS-RP which is used in RT-PCR method.

<400> 26

tctctccgac agatgtgtca gg 22

<210> 27

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Primer designated as F3'H-UP which is used in RT-PCR method.

<400> 27

catggcaact ctatttctca c 21

<210> 28

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Primer designated as F3'H-RP which is used in RT-PCR method.

<400> 28

cgtcaccgtc aagatcagtt cc 22

<210> 29

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Primer designated as DFR-UP which is used in RT-PCR method.

<400> 29

atggttagtc agaaagagac cg 22

<210> 30

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Primer designated as DFR-RT/r1 which is used in RT-PCR method.

<400> 30

gacacgaaat acatccatcc tg 22

<210> 31

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Primer designated as CHI-f1, which is used for amplifying CHI gene.

<400> 31

ctcaacaatg tcttcatcca acgcct 26

<210> 32

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Primer designated as CHI-r1, which is used for amplifying CHI gene.

<400> 32

cgaaaacgca accgtaagag ag 22

<210> 33

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Primer designated as F3H-f1, which is used for amplifying F3H gene.

<400> 33

gccggagagt ctaagctcaa ct 22

<210> 34

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Primer designated as F3H-r1, which is used for amplifying F3H gene.

<400> 34

ccacggcctg atgatcagca tt 22

<210> 35

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Primer designated as LDOX-f2, which is used for amplifying LDOX gene.

<400> 35

gatggttgcg gttgaaagag tt 22

<210> 36

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Primer designated as LDOX-r2, which is used for amplifying LDOX g

ene.

<400> 36

aaagcgctta catcggtgtg ag 22

<210> 37

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Primer designated as AN9-5', which is used for amplifying AN9 gene.

<400> 37

ggatccatgg ttgtgaaagt gcatgg 26

<210> 38

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Primer designated as AN9-3', which is used for amplifying AN9 gene.

<400> 38

gagctcgctcc cgtactccac aacaat 26

【図面の簡単な説明】

【図 1】 図1は、シロイヌナズナ (Arabidopsis) におけるフラボノイド生合

成経路および蓄積経路を示す。それぞれの段階を触媒する酵素、並びにかっこ内に記載した対応する遺伝子座が示される。調節遺伝子座を箱囲みで示す。推定される段階は、点線矢印として示す。アントシアニン類およびプロアントシアニジン類は液胞中に蓄積し、フラボノール類の一部は細胞壁に対して分泌されることに注目すべきである。CHSは、カルコン合成酵素；CHIは、カルコンイソメラーゼ；F3Hは、フラバノン3-ヒドロキシラーゼ；F3'Hは、フラボノイド3'-ヒドロキシラーゼ；DFRは、ジヒドロフラボノール4-還元酵素；FLSは、フラボノール合成酵素；LDOXは、ロイコアントシアニジンジオキシゲナーゼ；LARは、ロイコアントシアニジン還元酵素；ANRは、アントシアニジン還元酵素；TTは、トランスパレントテスト（TRANSPARENT TESTA）；TTGは、トランスパレントテストグラブラ（TRANSPARENT TESTA GLABRA）；BANは、バニユルス（BANYULS）；をそれぞれ示す。

【図2】 図2は、tt19変異株の表現型特性を示す。(A) および (B) は、育成チャンバー中で1ヶ月生育させたCol株 (A) およびtt19-1変異株 (B) における、茎の基部でのフラボノイド色素の蓄積を示す。(C) は、Col株 (左)、tt19-1変異株 (中央)、およびtt4変異株 (右) の熟成段階での成熟長角果を示す。(D) は、熟成段階 (C) からさらに7週間乾燥させた長角果を示す。スケールバーは、1 mmを示す。

【図3】 図3は、0.1 mMナリンゲニンを含むMS/スクロース/アガープレートまたは0.1 mMナリンゲニンを含まないMS/スクロース/アガープレートで生育させたシロイヌナズナ幼苗を示す。(A) および (B) はCol株を、(C) および (D) はtt19-1変異株を、(E) および (F) はtt4変異株をそれぞれ示す。(A)、(C) および (E) は、ナリンゲニン不存在下で生育させ、一方で (B)、(D) および (F) はナリンゲニン存在下で生育させた。すべての幼苗は、連続明期条件下、23℃にて5日間生育させた。スケールバーは、1 mmを示す。

【図4】 図4は、Col株 ([A]、[C]、および[E]) およびtt19-1変異株 ([B]、[D]、および[F]) の種子外被におけるPA前駆体の沈着パターンを示す。(A) および (B) はDAF1の未成熟種子を、(C) および (D) はDAF5の未成熟種子を、(E) および (F) はDAF17の種子外被部分を、それぞれ示す。スケールバーは、50 μ mを示す。

mを示す。

【図5】 図5は、2種のtt19変異株中の変異遺伝子座の模式図を示す。(A)はtt19-1変異株における構造変化を示す。GST-様遺伝子座が関与する大型の逆位が生じた。GST-様遺伝子のエクソンは、黒四角で示す。BAC F18022の染色体領域は灰色で示す。フィラーDNA領域を、網掛け四角で示す。6 bpフラグメント (F18022の98506-98511 ntに相当) は、逆位フラグメントの両方の境界において複製されている点に注目すべきである。それらを黒矢印で示した。(B)は、tt19-2変異株におけるGST-様遺伝子座の変異を示す。エクソンを黒四角で示す。灰色の矢印は、転写開始部位を示す。それぞれの番号は、BAC MKP11中でのnt位置を示す。MKP11の743-17466 nt中のフラグメントの一部を、PCRおよび配列解析によりtt19-2変異株ゲノム中で検出したが、しかし転座位置は不明である。

【図6】 図6は、TT19のタンパク質配列および系統樹を示す。(A)は、TT19 (At-TT19)、シロイヌナズナEST H36860 (At-H36860)、ペチュニアAN9 (Ph-AN9)、タバコparB (Nt-parB)、トウモロコシGSTI、GSTIII、GSTIV、およびBZ2 (Zm-GSTI、Zm-GSTIII、Zm-GSTIV、およびZm-BZ2)、そしてコムギGSTA1 (Ta-GSTA1)の推定アミノ酸配列の複数アラインメントを示す。これらのGSTについてのすべての参照は、Alfenitoら (1998、上述) 中に含まれる。同一なアミノ酸部位を、アスタリスクで示した。(B)は、(A)において示されたGSTタンパク質間の系統樹を示す。unrootedコンセンサスツリーがneighbor-joining法により得られた。ブートストラップ値は、それぞれの枝に示す。

【図7】 図7は、その真性プロモーターを有する野生型TT19遺伝子 ([A]および[B]) またはCaMV 35Sプロモーターにより発現制御されるペチュニアAN9遺伝子 ([C]および[D]) による、tt19変異株の機能的相補を示す。(A) および (C) はアントシアニン色素沈着を伴うT1幼苗であり、(B) および (D) は、熟成段階での種子色を示す。左から右へ: Col株の長角果、tt19の長角果、およびT1の長角果。陽性対照として、35S: TT19コンストラクトを含むT1の長角果を、(D) の一番右に示した。スケールバーは、1 mmを示す。

【図8】 図8は、Col株 (レーン1)、tt19-1変異株 (レーン2)、およびtt19-2変異株 (レーン3) におけるフラボノイド構造遺伝子についてのRT-PCRを示す

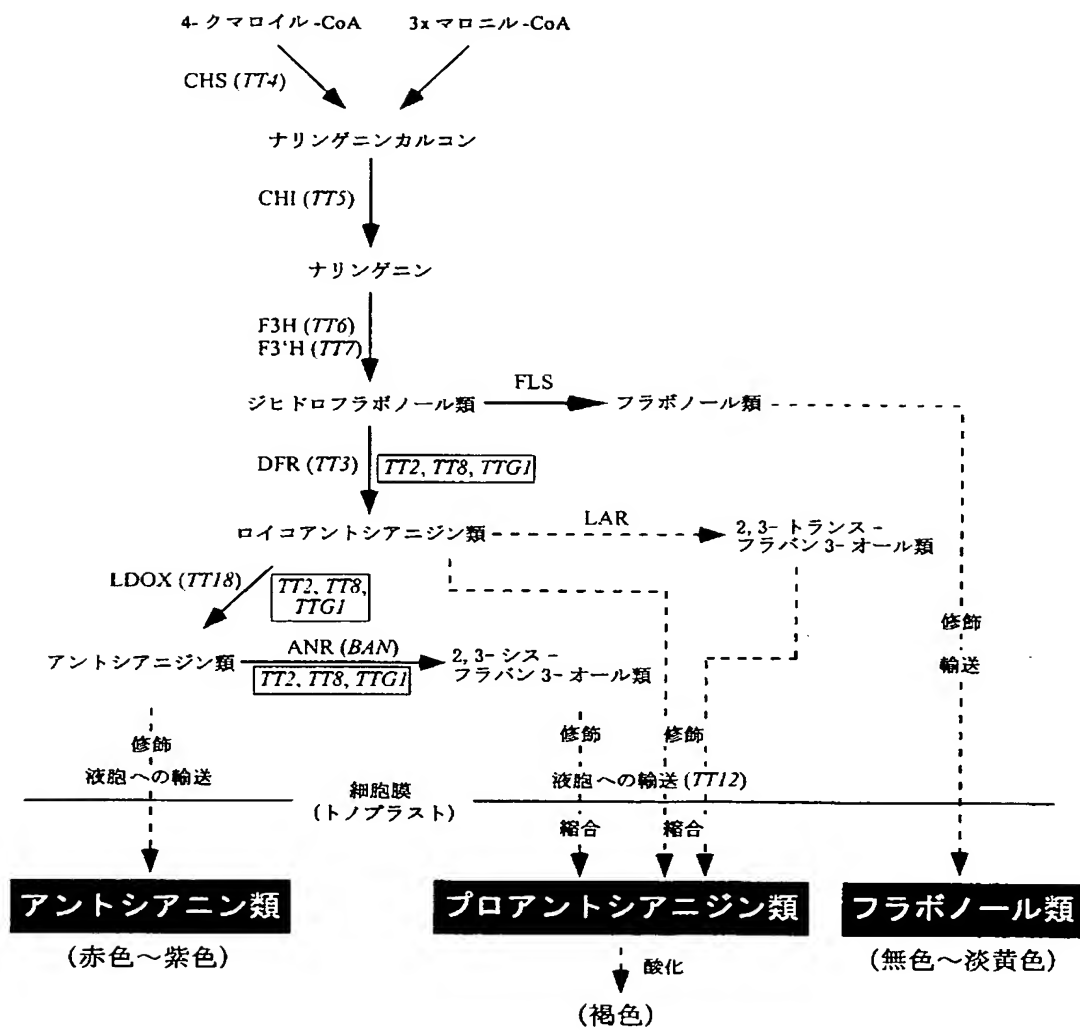
。EF1 α A4、伸長因子1 α A4；その他の略語は、図1中に含まれる。

【図9】 図9は、tt19 ban二重変異株の種皮表現型を示す。(A)はDAF8の未成熟長角果を示す。左から右へ：Col株、tt19、tt19 ban二重変異株、およびban。(B)はDAF20の成熟長角果を示す。左から右へ：Col株、tt19、tt19 ban二重変異株、そしてban。(C)はさらに熟成段階から7-週間の乾燥の後の種子色を示す。左から右へ：Col株、tt19、tt19 ban二重変異株、およびban。スケールバーは、1 mmを示す。

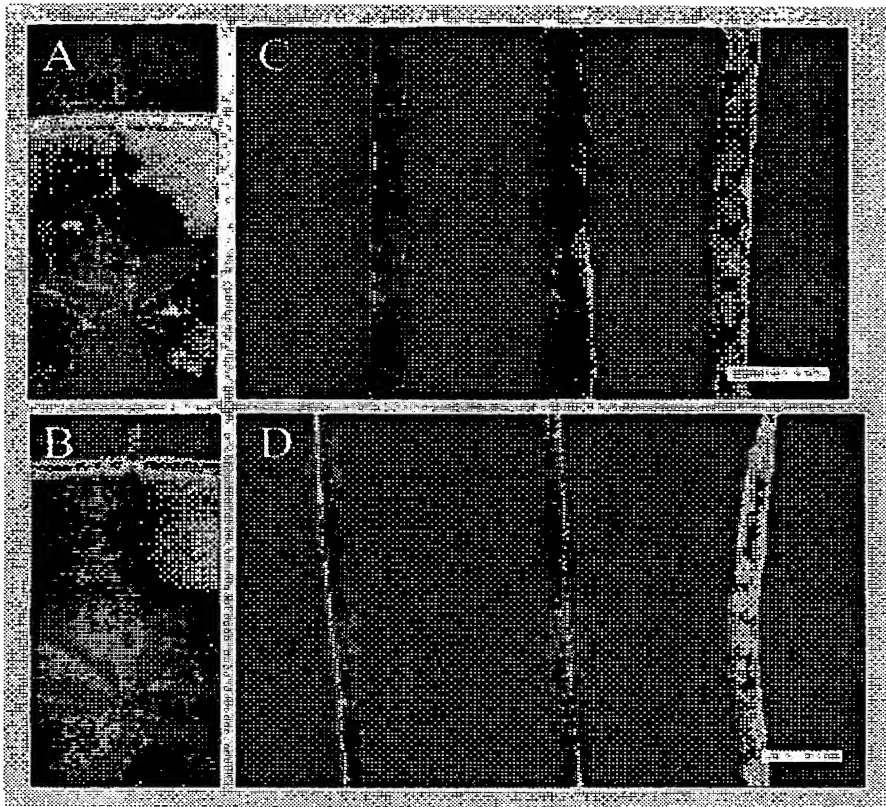
【図10】 図10は、シロイヌナズナにおけるフラボノイド後期生合成経路およびそれらの蓄積を示す。UGT、UDP-グルコース：フラボノイドグルコシルトランスフェラーゼ；GST-様、グルタチオンS-トランスフェラーゼ-様；GS-Xポンプ、グルタチオン-特異的ポンプ；その他の略語は、図1中に含まれる。

【書類名】 図面

【図 1】



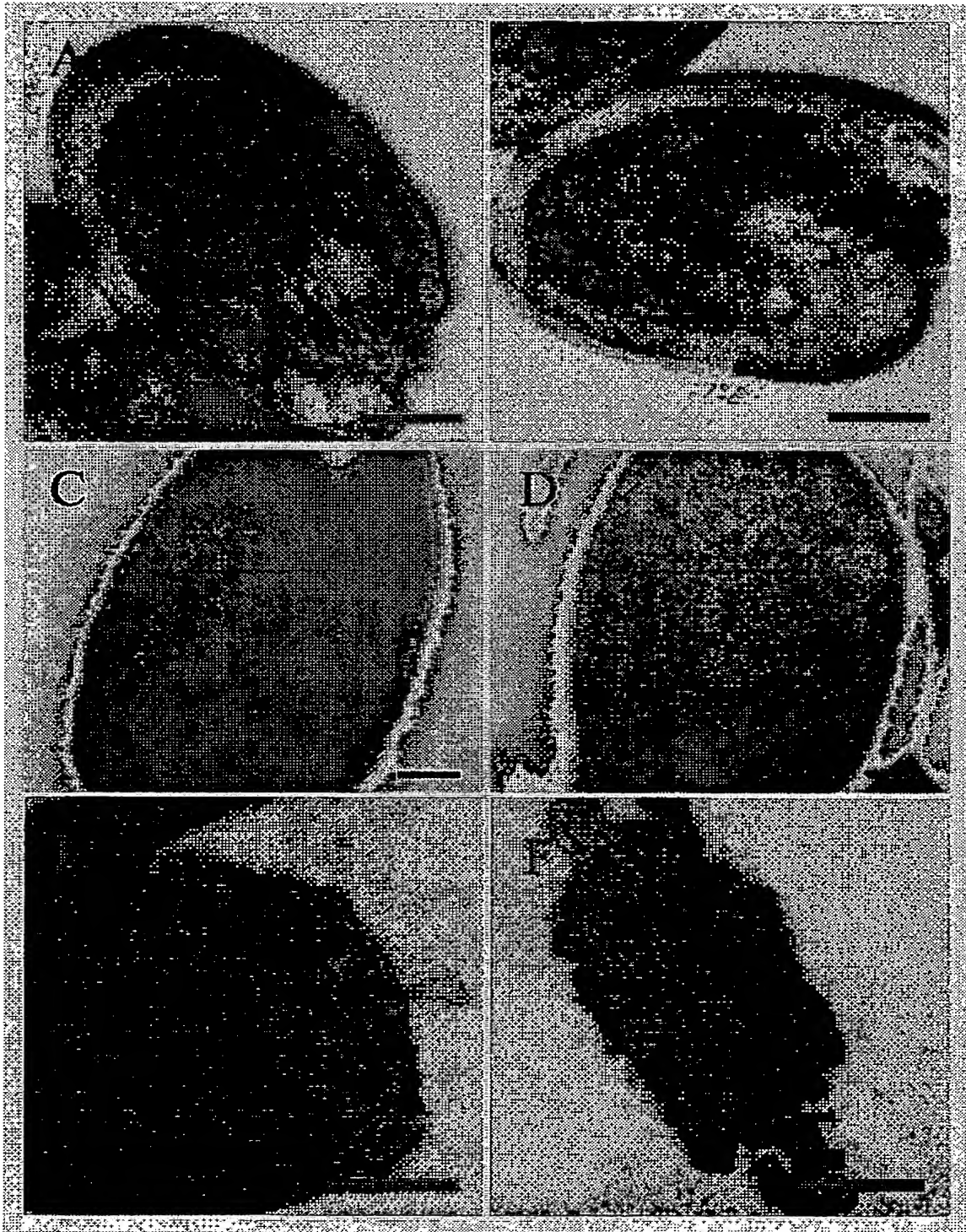
【図 2】



【図 3】

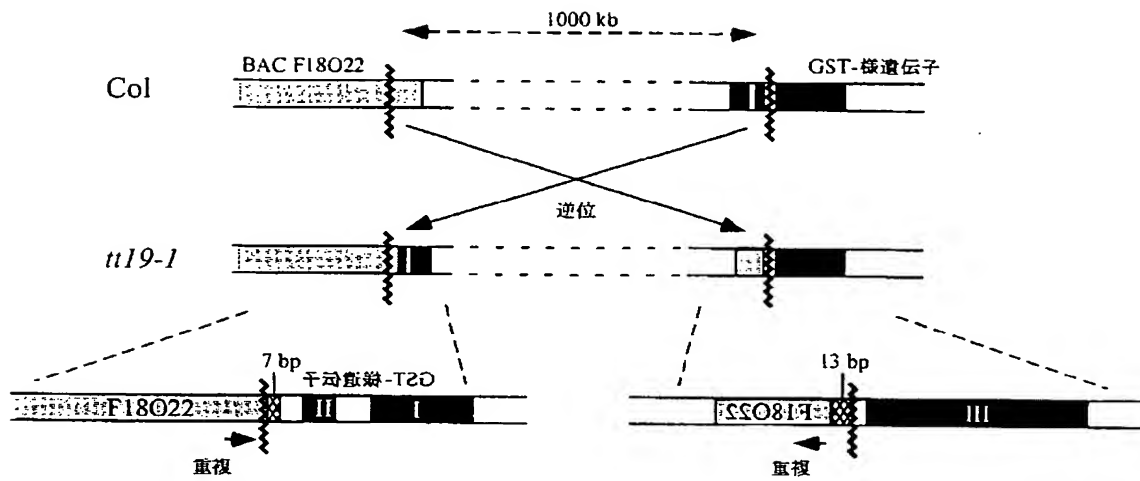


【図 4】

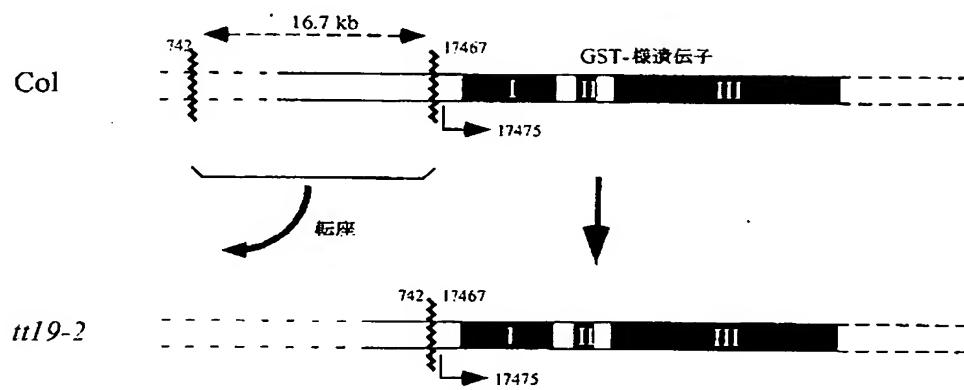


【図 5】

A



B



【図 6】

A

At-TT19 ---NVKLYGQNTAACPORVLLCFLEKGI EFEI I HIDLDFEQKKPEHL LROP-FGQVPA
 At-H36860 ---NVKLYGQNTAACPORVLLCFLEKDI EFEVI HVLDLXLEQKKPQHL LROP-FGQVPA
 Ph-AN9 ---NVKLYGQNTAACPORVLLCFLEKDI EFEVI HVLDLXLEQKKPQHL LROP-FGQVPA
 Nt-parB ---NAIKVHGSPHSTATIRVAVACL IEKELDFEVPVDMASGEHKKHPTLSLNP-FGQVPA
 Zm-GSTIII ---NAPKLYGQPLSPHVVAVATVLENEKGLDFEIVPVDTTGAHKKPQHL LROP-FGQVPA
 Zm-GSTI ---NAPKLYGQPLSPHVVAVATVLENEKGLDFEIVPVDTTGAHKKPQHL LROP-FGQVPA
 Zm-GSTIV MATPAKVYGVWAI SPFYSRALLALEACSDYEIVPI NFATAEHKSPQHL LROP-FGQVPA
 Ta-GSTA1 ---MSPKLYGQPLSPHVVAVATVLENEKGLDFEIVPVDTTGAHKKPQHL LROP-FGQVPA
 Zm-BZ2 ---MRVLGGEVSPFTARALALDLRGVAYELL--DEPLGPKKSDRLAANPVYGI PV

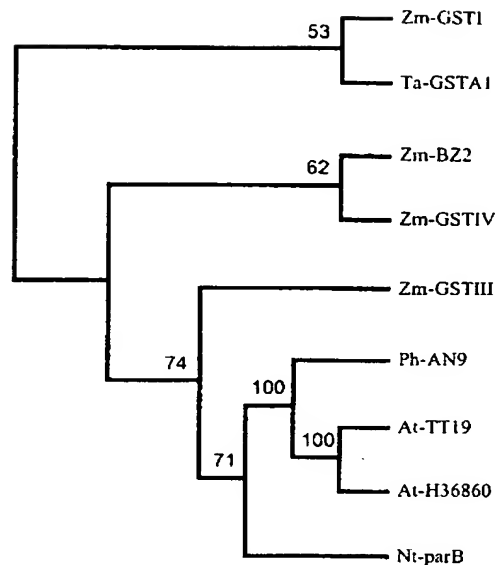
At-TT19 IEDGD-FKL FESRAI ARYYATKFAQQ----GTNLLGKSL--EHRAIVDQKADVEYYFHH
 At-H36860 IEDGD-LKL FESRAI ARYYATKFAQQ----GTDLLGKTL--EGRAIVDQKADVEYYFHH
 Ph-AN9 IEDGD-FRL FESRAI IRYYAAKYEVK----GSKLTGTTL--EEKALVDDKLEVESNRYN
 Nt-parB IEDGD-LKL FESRAI TOYIAHYADN----GYOLLQDP--KIKWPSMSVWNEVEGQKFE
 Zm-GSTIII LVDGD-EVL FESRAI NRYIASKYASE----GTDLLPATA--S-AAKLEVWLEVESHHFH
 Zm-GSTI LVDGD-LYL FESRAI CKYAAKRNK----PELLREGH--LEEAAMVDVWLEVEAHQYS
 Zm-GSTIV LVDGD-LTL FESRAI ARHVLKRNK----PELLGGR--LEOTAMVDVWLEVEAHQYS
 Ta-GSTA1 FDDGD-LVL FESRAI AKYILRKYGGTA----GLDILGNSGIEELAMVDVWLEVEAHQYS
 Zm-BZ2 LLLPDGRAICSAVVOYIEDVARESGGAEAGSLLPDOP--YERAMHRTAFIDOKFW

At-TT19 VLAQPLVINLI IKPRLG----EKCDVVLVEDLKVKLGVLVDI YNNRLSSNRFLAG-EFFT
 At-H36860 AVALPLVMDVVFVKPSG----KPCDVALVEELKVKFDKVLVDYENRLATNRYLGG-DEFT
 Ph-AN9 DLVYNMVLQLLVFPKMG----QTSDLTLVTCKANKLENVFDI YEQRLSKSKYLAG-EFFS
 Nt-parB PPATKLTWELGKPIIG----MTTDDAAVKESEAKLKVLDI YETQLAESKYLAG-DSFT
 Zm-GSTIII PNASPLVFLQLVRLPILG----GAPDAAVVEKHAQLKVLVDYEAHLARNKYLAG-DEFT
 Zm-GSTI AALNPIFLQVLISPMILG----GTTDDQVVDENKELKVLVDYEAHLARNKYLAG-DEFT
 Zm-GSTIV PPAIATVVECVFAPFLG----RERNDQAVVDENKELKVLVDYEAHLARNKYLAG-DEFT
 Ta-GSTA1 PAISPVVFECI IIPFI PGGAAPNQTIVVDESLERLRGVLGYEARLEKSRYLAG-DSIT
 Zm-BZ2 PALDAVS----LAPTPG----ARAQAAEDTRAALSLLEAFKORSNGRAFFSGGDAAP

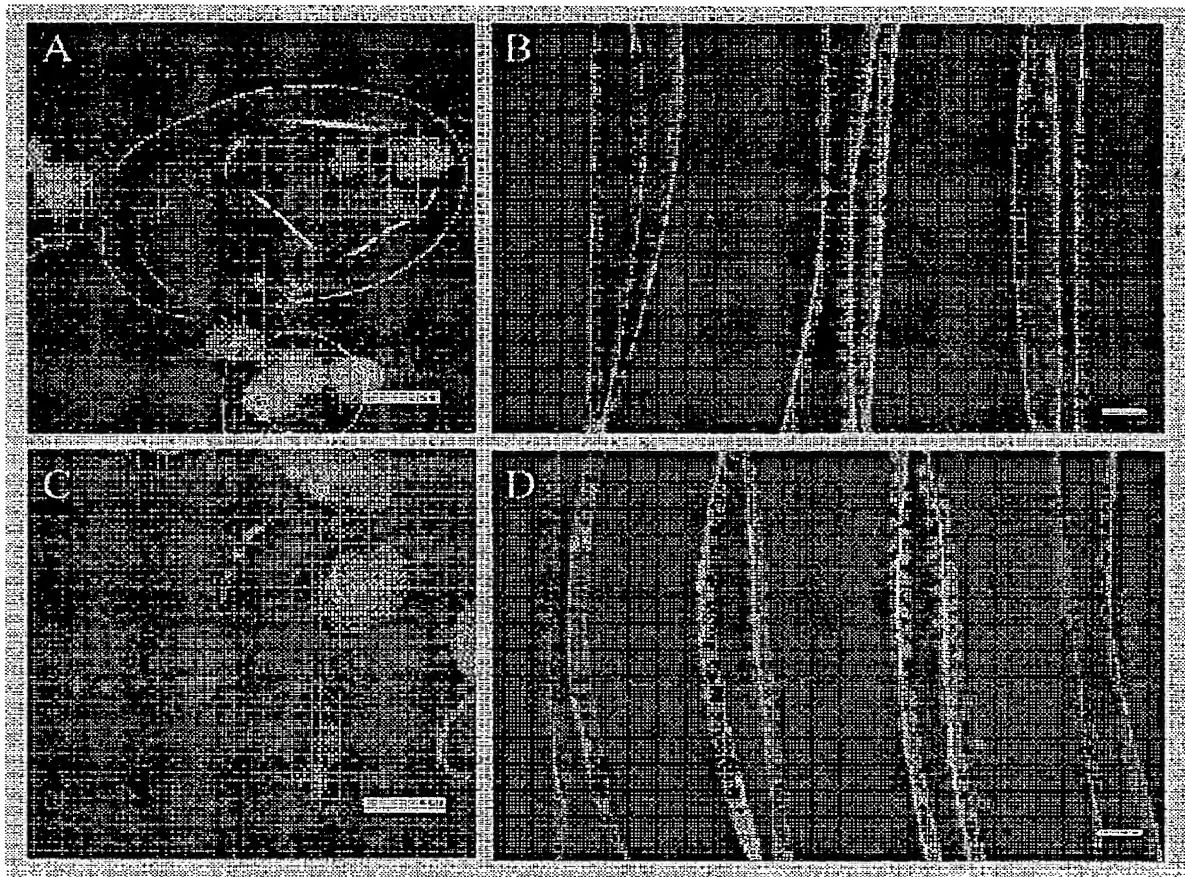
At-TT19 ---MADLTHMPAGCYLMSITDIN--OMVKA--RGSFNRMWEEISDRPSWKKLIMLAGH----
 At-H36860 ---MADLTHMPAGCYLMSITDIN--OMVKA--RGSFNRMWEEISDRPSWKKLIMLAGH----
 Ph-AN9 ---MADLTHMPAGCYLMSITDIN--OMVKA--RGSFNRMWEEISDRPSWKKLIMLAGH----
 Nt-parB ---MADLTHMPAGCYLMSITDIN--OMVKA--RGSFNRMWEEISDRPSWKKLIMLAGH----
 Zm-GSTIII ---MADLTHMPAGCYLMSITDIN--OMVKA--RGSFNRMWEEISDRPSWKKLIMLAGH----
 Zm-GSTI ---MADLTHMPAGCYLMSITDIN--OMVKA--RGSFNRMWEEISDRPSWKKLIMLAGH----
 Zm-GSTIV ---MADLTHMPAGCYLMSITDIN--OMVKA--RGSFNRMWEEISDRPSWKKLIMLAGH----
 Ta-GSTA1 ---MADLTHMPAGCYLMSITDIN--OMVKA--RGSFNRMWEEISDRPSWKKLIMLAGH----
 Zm-BZ2 ---MADLTHMPAGCYLMSITDIN--OMVKA--RGSFNRMWEEISDRPSWKKLIMLAGH----

At-TT19 -----
 At-H36860 -----
 Ph-AN9 IEAVSIPAKEEAKV-----
 Nt-parB -----
 Zm-GSTIII SSSA-----
 Zm-GSTI -----
 Zm-GSTIV PKQDE-----
 Ta-GSTA1 GAQY-----
 Zm-BZ2 TRFLQVQADFVHVS-----

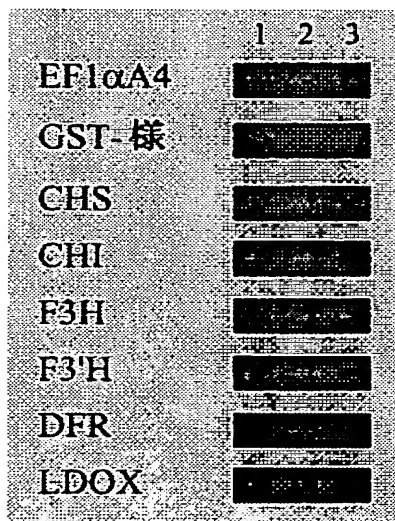
B



【図 7】



【図 8】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 本発明は、tt19変異株の特徴を解析することを課題とするとともに、tt19変異株を引き起こす原因遺伝子を同定し、その性質を解析することを課題とする。さらに、同定された原因遺伝子の性質を利用して、形質転換植物体を提供することもまた課題とする。

【解決手段】 本発明の発明者らは、tt19変異株の原因遺伝子を解析し、そしてtt19変異株の性質を解明することにより、上記課題について種々検討した結果、トランスパレント・テスト19 (TT19) 遺伝子と命名した新規の遺伝子をクローニングし、その遺伝子のDNA塩基配列の解析およびそのTT19遺伝子のDNAによりコードされるタンパク質の解析を行うことにより、上述した課題を解決した。

【選択図】 なし

特願 2 0 0 3 - 0 6 6 3 1 0

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[0 0 0 0 0 4 0 9 7]

1. 変更年月日

2 0 0 3 年 1 月 2 7 日

[変更理由]

住所変更

住 所

千葉県柏市末広町 1 4 番 1 号

氏 名

日本原子力研究所